

콩 검은뿌리썩음병균 (*Calonectria ilicicola*)의 형태적 특징과 유전자 수준에서의 동정

박성우 · 김홍식¹ · 우선희¹ · 심형권² · 김흥태*

충북대학교 농업생명환경대학 응용생명환경학부 식물의학전공, ¹식물자원생산학부 식물자원학전공, ²호남농업연구소 식물환경과

Morphological Characteristics and Molecular Identification of *Calonectria ilicicola* Causing Soybean Red Crown Rot

Seong Woo Park, Hong Sik Kim¹, Sun Hee Woo¹, Heong Kwon Shim² and Heung Tae Kim*

Department of Plant Medicine, College of Agriculture, Life and Environment Sciences, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

¹Department of Crop Science, College of Agriculture, Life and Environment Sciences, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

²Honam Agricultural Research Institute, #381 Songhak-Dong, Iksan, Cheonbuk 570-080, Korea

(Received on November 16, 2006)

The 18 isolates of soybean red crown rot pathogen (*Calonectria ilicicola*) were isolated from infected soybean plants showing chlorosis symptom and red perithecia sign in 2002 and 2003 season in Korea. The morphological characteristics of the typical isolate SC03-15, such as macroconidia and macrovesicles in anamorph as well as perithecia, asci and ascospores in teleomorph, were observed from red crown rot pathogens. The perithecia were red-brown globose to ovoid, and 357.9 (312.5~391.5.7) μm high and 474.3 (419~535) μm diameter. Asci were hyaline and clavate and included 8 ascospores, which were straight to slightly curved, 1(-3)-septate, and 36.9(31.1~49.4) \times 5.2(4.5~6.1) μm . Macroconidia in anamorph were cylindrical, hyaline and in size 73.2 (68.1~77.6) \times 5.8(4.9~6.8) μm . Further identification process was performed through molecular method, such as a phylogenetic analysis by rDNA sequencing of ITS and β -tubuline genes of all isolates tested in this study. All isolates were identified as *Calonectria ilicicola* by DNA sequencing of ITS and β -tubuline genes, and morphological characteristics.

Keywords : *Calonectria ilicicola*, Morphological identification, Phylogenetic analysis, Soybean red crown rot

콩 검은뿌리썩음병은 브라질, 카메룬, 동부 유럽, 일본과 미국 등에서 이미 문제가 되는 병으로 알려져 있으며, 심한 경우에는 50% 이상 피해를 받거나 죽는 것으로 보고된 바 있다(Berner 등, 1986; Glenn, 2001). 검은뿌리썩음병의 원인이 되는 병원균은 *Calonectria ilicicola*(무성세대: *Cylindrocladium parasiticum*)이며, 동부, 블루베리, 담배 등의 다른 작물에서도 병을 일으킨다(Crous 등, 1993). 1975년까지 미국에서는 주로 알팔파에 큰 피해를 주었으나 콩에는 피해가 적었다. 그러나 1976년 플로리다에서

재배하였던 땅콩에서 대발생하여, 땅콩 포장에서의 감염율이 50%에 육박하였으며, 루이지애나에서도 콩에 큰 피해를 준 것으로 보고되었다(Kucharek, 2000).

콩은 우리나라와 일본을 포함한 아시아권은 물론 세계적으로도 식량으로서 그 중요성이 매우 크며, 지력유지 및 증진을 위한 작부체계의 측면에서도 매우 중요한 작물이다(김과 조, 2005). 또한 콩은 우리나라에서 오래 전부터 전통식품으로 이용되어 왔으며(윤과 주, 2002), 최근에는 성인병 예방은 물론 항암효과에 대한 연구결과들도 보고됨으로써 영양 및 건강식품으로 각광받아 콩의 수요가 증가하고 있다(김과 조, 2005). 따라서 2002년부터는 콩 재배가 적극 권장되고, 콩 재배 농가에 대한

*Corresponding author

Phone) +82-43-261-2556, Fax) +82-43-271-4414

E-mail) htkim@chungbuk.ac.kr

소득 보전 정책을 추진하게 되어, 소규모 밭에서 행해지던 콩 재배가 대규모의 논으로 확산되고 있다(김과 조, 2005). 이미 일본에서는 2000년부터 논에서 콩의 재배를 증가시키기 위한 정책이 실시되어 2001년에는 논에서의 콩 재배면적이 114,000 ha에 달하고 있는 것을 보면(아리하라, 2002), 우리나라에서도 향후 논 콩 재배면적이 크게 확산될 것으로 예상된다.

이렇게 콩 재배가 논으로 확산됨에 따라 재배조건 변화, 특히 밭 토양에서 논토양으로의 변화에 따라 기존에 문제가 되지 않았던 병해가 발생하여 충분히 문제를 일으킬 수 있는 가능성이 있을 것으로 생각한다. 2004년까지 우리나라 콩에서 확인된 병의 종류는 64종(한국식물병명목록, 2004)이며, 이들 중 습한 토양에서 발생하기 쉬운 콩 검은뿌리썩음병은 논토양에서 콩 재배가 확산됨으로써 문제가 될 것으로 예상된다.

*Cylindrocladium*은 *Calonectria*의 불완전세대로 알려져 있으며, *Cylindrocladiella*, *Curviadium*, *Gliocladiopsis*, *Xenocylindrocladium* 등과 생태적으로 동일하거나, 형태적으로 유사한 것으로 보고되어 있다(Crous, 2002). 이들은 열대와 아열대 지역에 전반적으로 넓게 분포하고, 두과류와 감자와 같은 작물뿐만 아니라 *Eucalyptus*, *Pinus*, *Acacia* 등과 같은 수목에 병원성을 보인다고 알려져 있다. 특히 *Cylindrocladium*과 *Cylindrocladiella*는 작물에 병을 일으킬 때, 두가지 또는 그 이상의 다른 종들과 함께 복합적으로 병을 유발하기도 한다. 따라서 병 방제를 하거나 저항성 품종을 육성하기 위해서는 병원균의 정확한 동정이 필수적이다. 콩 검은뿌리썩음병균은 1966년 Bell과 Sobers에 의해서 *Calonectria crotalariae*(무성세대: *Cylindrocladium crotalariae*)로 보고되었으나, 1993년 Crous가 그 무성세대를 *Cylindrocladium parasiticum*로 동정하였으며, 그 완전세대는 과거에 보고되어 있던 *Calonectria ilicicola*로 분류하였다(Crous, 2002). 국내에서는 성(1980)에 의해서 콩 검은뿌리썩음병이 *Cylindrocladium crotalariae*로 보고되어 있었으며, 성과 정(1983)은 검은뿌리썩음병균인 *Cylindrocladium crotalariae*가 콩의 수량감소에 미치는 영향을 보고하였다. 하지만 김 등(1988)은 콩의 나이가 검은뿌리썩음병균의 감염에 미치는 영향에 대해서 보고하면서 그 병원균을 *Calonectria ilicicola*로 보고하였다. 따라서 국내에서도 검은뿌리썩음병에 대한 정확한 동정이 필요하게 되었다.

본 연구에서는 2002년과 2003년 8월 중에 충청남북도, 전라남북도, 경상남북도의 콩 재배 포장에서 지상부에 황화 증상을 보이며 뿌리가 검게 부패하고 지제부에 붉은색의 자낭각이 형성된 콩을 채집하여 병원균을 단포자 분리하고, 병원균의 형태적인 특징과 특정 부위 DNA의 염

기서열 분석을 통한 유전자 수준에서 동정을 수행하였다.

재료 및 방법

병원균의 채집 및 분리와 보존. 2002년과 2003년 8월에 전국의 콩 재배지역에서 지상부가 황화되고 지제부에는 붉은색의 자낭각이 보이는, 콩 검은뿌리썩음병균에 감염된 것으로 의심되는 식물체를 채집하였다. 흐르는 물로 채집한 시료의 흙을 세척하고 지제부의 조직 절편을 1% sodium hypochloride 용액에서 1분간 표면 살균한 후, 300 µg/ml의 streptomycin을 함유한 PDA 배지에 치상하여 25°C의 항온기에서 배양하였다. 조직의 절편에서 나온 균사의 선단을 새로운 PDA에 이식하였다. *Fusarium* spp. 등 기타 균이 섞여 나오는 경우 균을 확보하기 어려우므로 지속적으로 균총을 육안으로 관찰하여 기타 균과 구분하였고 현미경 관찰을 통해 검은뿌리썩음병균을 확인하였다. 지제부에서 자낭각이 관찰되는 시료는 검은뿌리썩음병균 일 확률이 높기 때문에 멸균한 핀셋으로 지제부에서 자낭각을 떼어내어 PDA 배지에 치상하였다. 이때도 육안으로 확인한 자낭각의 형태가 *Nectria* spp.와 유사하므로 분리에 주의하였다. 콩 검은뿌리썩음병균으로 확인된 균주는 단포자 분리하여 실험에 사용하였다.

분리한 콩 검은뿌리썩음병균의 균주는 25°C의 PDA에서 7일간 배양한 후, 균사선단부에서 지름 5 mm의 균사 조각을 떼어내어 PDA 사면배지에 접종하고 25°C에서 7일 배양한 후, 4°C에서 보관하며 실험에 사용하였다. 병원균의 장기 보관을 위하여 25°C에서 7일 배양한 균총의 선단에서 떼어낸 직경 5 mm의 균사조각을 5 ml의 멸균수를 넣어 상온에서 보관하였다.

실험에 사용한 콩 검은뿌리썩음병균. 국내에서 분리한 19균주와 일본에서 분양받은 8균주를 합하여 총 27균주를 실험에 사용하였다. 국내에서 분리한 균주는 1997년에 분리하여 호남농업시험장에서 보관하던 Cc097-1 균주만을 분양받아 실험에 사용하였으며, 2002년에 분리한 2균주와 2003년에 분리한 16균주를 실험에 사용하였다.

콩 검은뿌리썩음병균의 형태적 동정. 병원균의 형태적 동정을 위하여 PDA 배지에서 균총의 색을 관찰하였고, 자낭각, 자낭, 자낭포자, 분생포자, 소낭의 크기와 형태를 조사하여 *Calonectria ilicicola*의 형태적인 특징과 비교하였다. 분리한 균주 중에서 SC03-15를 PDA 배지에 접종하고 25°C에서 2주간 배양하면서 균총의 색깔을 관찰하였다. 형태적 동정에 필요한 분생포자를 형성시키기 위하여 SC03-15를 0.2%의 yeast extract를 첨가한 PDA에 접종하고 25°C에서 7일간 배양하였다. 배지 위에 형성된 기

중 균사를 제거하고, 2일 동안 24시간 광을 조사한 후, 형성된 분생포자를 수확하여 관찰하였다. 자낭각, 자낭, 자낭포자, 소낭의 경우 분생포자 수확 방법과 같은 방법으로 형성을 유도하였는데 분생포자와는 다르게 약 2주간 배양 후 수확하여 관찰하였다.

검은뿌리썩음병균의 DNA 추출. 병원균을 PDB에 접종한 후 25°C에서 150 rpm으로 7일간 진탕 배양하였다. 멸균 증류수를 사용하여 병원균을 세척한 후 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하고 수확하여 -20°C에서 냉동시킨 후, 24시간동안 동결건조하였다. 동결건조시킨 균사를 곱게 마쇄한 다음, lysis buffer(50 mM Tris-buffer(pH 8.0), 50 mM EDTA, 0.5 M NaCl, 1% SDS)를 첨가하고 고르게 저어 현탁시켰다. 65°C에서 30분간 처리한 DNA 현탁액을 tube에 넣고 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1)의 혼합액을 첨가한 후 가볍게 진탕하였다. 다시 65°C에서 30분간 처리하고 13,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 상정액을 튜브로 옮긴 후 isopropanol을 첨가하고 충분히 진탕하였다. 다시 13,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상정액을 버리고, 70% 에탄올로 DNA의 침전물을 세척하였다. 세척할 때 DNA의 침전물이 떨어져 나가지 않도록 조심하였다. 세척한 DNA는 상온에서 하루 동안 풍건시킨 후, 100 µl의 살균증류수에 녹인 후 사용할 때까지 -20°C에서 보관하였다.

rDNA의 ITS 영역과 tubulin 유전자(tub2)의 염기서열 분석을 통한 종 동정. ITS 영역의 DNA를 증폭하기 위해서 universal primer인 ITS5(5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3')와 ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC G-3')를 사용하였다(White 등, 1990). DNA 증폭을 위한 25 µl의 반응액(template로 사용할 병원균의 DNA 5 µl; 10배의 Taq buffe 2.5 µl; dNTP 2.5 µl; ITS5 0.5 µl; ITS4 0.5 µl; Taq polymerase, 0.125 µl; 살균증류수 13.875 µl)을 만들어 반응시켰다. 반응조건은 94°C에서 4분동안 pre-denaturation을 실시하였고, 95°C에서 30초간 denaturation, 50°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분 동안 extension하는 것을 30회 수행한 후, 72°C에서 7분간 최종 반응시켰다. PCR산물은 2% agarose gel을 만들어 50 V에서 120분 동안 전기영동하였다. 전기영동 후 밴드를 확인하고, PCR 산물은 PCR Purification Kit를 사용하여 순화한 후, Eugentech(대전)에 sequencing을 의뢰하였다. Tubulin 유전자의 증폭을 위해서는 Peres 등(2004)이 사용한 TB2L(5'-GYT TCC AGA TYA CCC ACT CC-3')과 TB2R(5'-TGA GCT CAG GAA CRC TGA CG-3')의 primer를 사용하였다. 반응조건은 pre-denaturation 95°C에서 2분, denaturation 95°C에서 1분, annealing 55°C에서

Table 1. Disease severity scale of wound inoculation test

Scale	Disease symptoms
0	No symptoms
1	Browning of inoculation site
2	Browning of crown and tap root
3	Extension of browning to secondary roots
4	Falling off the high position secondary roots, severe decay of tap root
5	Most of secondary roots were falling off, severe decay of tap root

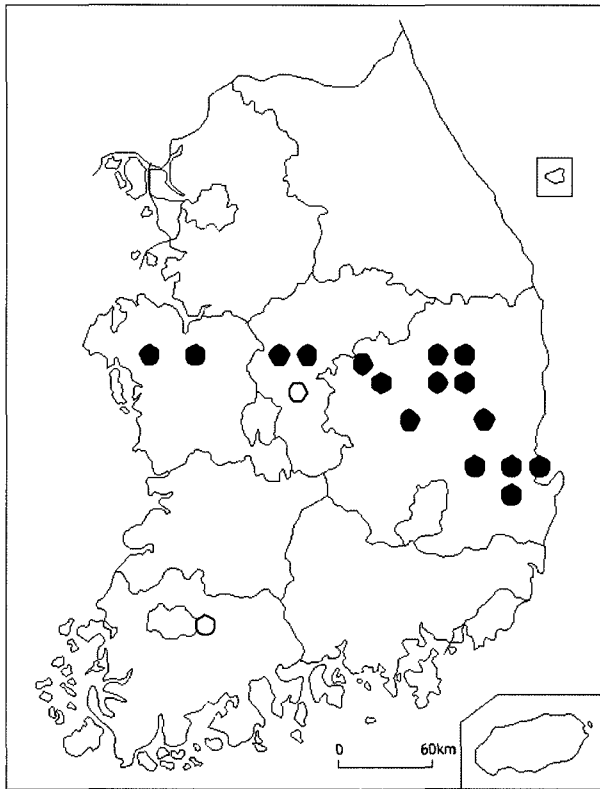
1분, extension 72°C에서 1분으로 40 cycle 수행한 후 72°C에서 5분간 반응시켰다. PCR 산물의 확인과 염기서열의 분석은 ITS 영역의 경우와 동일한 방법으로 수행하였다.

병원성 검정. 플라스틱 포트(지름; 10 cm, 높이; 11 cm)에 콩 검은뿌리썩음병균에 대하여 '백천'과 '한남' 콩을 과중한 후 2엽이 나오는 시기까지 온실에서 재배하였다. 각 식물체의 지체부에서 토양을 조심스럽게 제거한 후, 지체부의 줄기에 칼로 길이 3 mm, 깊이 3 mm의 상처를 내었다. 25°C의 PDA에서 7일간 배양한 균총의 선단에서 지름 5 mm의 균사조각을 떼어 지체부의 상처에 균사면이 상처부 위에 접촉할 수 있도록 붙이고 복토하였다. 접종하고 40일 동안 온실에서 콩을 재배하며 발병을 유도하였는데, 접종한 병원균의 균사조각이 떨어지지 않도록 전 재배기간동안 저면 관수하였다. 병조사는 접종하고 40일 후(병이 충분히 발병한 시점)에 접종한 콩을 뿌리가 상하지 않도록 조심스럽게 물로 세척하여 Table 1의 발병지수에 따라 실시하였다.

결과 및 고찰

병원균의 분리. 2002년에 총 2균주가 분리되었고 2003년에는 충북과 충남의 2균주씩을 제외한 12균주 모두 경북 지역에서 분리되었다(Fig. 1). 콩 재배 지역이 모여 있는 전북, 전남, 경남 지역에서는 대부분 *Fusarium* spp.이 분리되었다. 지상부의 황화된 병징과 지체부에 형성된 붉은 자낭각을 확인하고 채집하였지만, 상당 부분의 병든 콩에서 *Fusarium* spp.이 분리된 것을 보면 콩 검은뿌리썩음병이 *Fusarium* spp.에 의한 시들음병의 병징과 비슷하여 현장에서 쉽게 구별하기 어려웠던 이유 때문으로 생각한다(Crous, 2002).

콩 검은뿌리썩음병균의 형태적 동정. 병원균의 형태적 동정을 위하여 배지에서 의 균총의 색과 자낭각, 자낭, 자낭포자, 분생포자, 소낭의 크기와 형태를 조사하였다. Table



○: Isolated in 2002
●: Isolated in 2003

Fig. 1. Isolated place of *Calonectria ilicicola* in 2002 and 2003.

2에서 보여주는 것처럼 분리한 병원균 중에서 선발한 SC03-15의 균총의 색, 자낭각, 자낭, 자낭포자, 분생포자, 소낭 등의 특징을 Crous 등(1993)이 보고한 *Cylindrocladium parasiticum*의 특징과 비교하였다. 그 결과 SC03-15는 PDA 배지에서 배양 초기에는 흰색이었다가 점점 갈색으로 균사의 색이 변하고, 배지의 색깔은 적갈색을 나타냈다. 자낭각의 크기는 $357.9(312.5\sim391.5.7)\times474.3(419\sim535)\mu\text{m}$

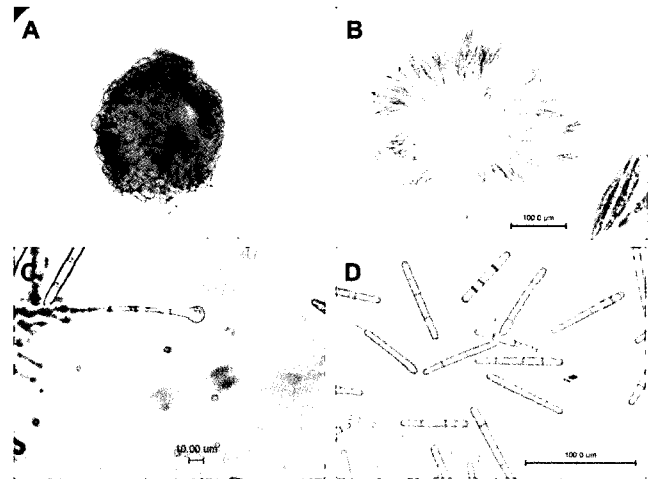


Fig. 2. Morphological characteristics of *Calonectria ilicicola* (*Cylindrocladium parasiticum*) SC03-15 isolated from soybean. A; Perithecium, B; Asci and ascospores, C; Vesicle, D; Conidia.

로 구형 또는 난형의 모습이었다(Fig. 2). 자낭은 무색투명한 곤봉상의 모양을 나타내고 있었으며, 그 크기는 $90.9\times15.0\mu\text{m}$ 이었다. 자낭 안에는 8개의 자낭 포자가 형성되는데, 자낭포자는 무색투명하며 1-3개의 격벽을 지니고 크기는 $36.87(31.1\sim49.4)\times5.22(4.5\sim6.1)\mu\text{m}$ 로, 약간 굽은 긴 형태의 모습을 나타내고 있었다. 무성생식세대에 만드는 분생포자의 크기는 $73.24(68.1\sim77.6)\times5.76(4.9\sim6.8)\mu\text{m}$ 로 자낭포자보다 컸으며, 그 모양은 Fig. 2에서처럼 긴 원통형이었고 색깔은 투명하였다. 소낭의 모양은 둥근 모양이며 크기는 지름이 $8.46(6.2\sim10.0)\mu\text{m}$ 로 관찰되었다.

ITS 영역과 tubulin 유전자의 염기서열분석을 통한 동정. 형태적 특성에 의해 진균을 분류·동정을 하는데 어려움이 많기 때문에, 최근에는 분자생물학적인 기술을 사용하여 동정을 시도하는 경우가 많은데, 생물적 방제제로 사용되는 *Trichoderma* spp.를 동정하기 위해서 ITS1 과 translation elongation factor 1 유전자의 염기서열을 분

Table 2. Morphological characteristics of *Calonectria ilicicola* (*Cylindrocladium parasiticum*) isolated from soybean

Characteristics	<i>Calonectria ilicicola</i>	SC03-15
Colony color on PDA	white at first and getting brown the bottom of media color → red-brown	white at first and getting brown the bottom of media color → red-brown
Perithecia	spherical shape or obovate shape, orange-red color, 280-400 × 300-500 mm	spherical shape or obovate shape orange-red color, 357.9(312.5-391.5.7) × 474.3 (419-535) mm
Asci	clavate shape with little curve, hyaline, 90-140 × 12-19 mm	clavate shape with little curve, hyaline, 90.9 × 15.0 mm
Ascospores	falcate shape with little curve, 1-3 septae, hyaline, 45(30-65) × 5.5(4.5-6.5) mm	falcate shape with little curve, 1-3 septae, hyaline, 36.9(31.1-49.4) × 5.2 (4.5-6.1) mm
Conidia	hyaline, cylindrical, 3-septate, 58-107 × 4.8-7.1 mm	hyaline, cylindrical, 3-septate, 73.24(68.1-77.6) × 5.76(4.9-6.8) mm
Vesicles	sphaeropedunculate shape, 7-10 mm in diameter	globose shape, 8.46(6.2-10.0) mm in diameter

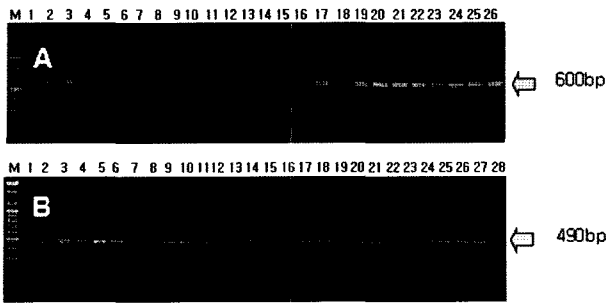


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction (PCR) products. **A**; Amplification of the ITS region, **B**; Amplification of the Tubuline gene. M represented DNA marker used in this study.

석하여 phylogenetic analysis를 수행하거나(Hermosa 등, 2004), *Colletotrichum graminicola*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* 등의 species complex를 위해서 MAT1-2 유전자를 분석하기도 하였다(Du 등, 2005). Kang 등(2001)은 β -tubulin 유전자와 ITS의 DNA 염기서열 분석을 통한 phylogenetic analysis에서 *Cylindrocladium floridanum*과 *Cylindrocladium spathiphylli*의 혼합종을 *C. floridanum*, *C. canadens*, *C. pacificum*과 *C. spathiphylli*와 *C. pseudospathiphylli*로 분류하였다. 본 실험에서 분리한 병원균의 유전자 수준에서의 동정을 위해서 ITS 영역과 tubulin 유전자를 PCR을 이용하여 증폭한 결과, Fig. 3에서 보는 바와

같이 각각 600과 490 bp의 PCR 산물을 확인할 수 있었다. 각각의 PCR 산물을 순화하여 염기서열을 판독하고, Maximum Parsimony 방법과 Neighbor-joining 방법을 이용하여 계통분류학적인 분석을 수행한 결과, ITS영역의 경우 실험에 사용한 모든 균주들 모두 NCBI에 등록되어 있는 *C. parasiticum*(완전세대 : *Calonectira ilicicola*)과 같은 종임이 확인되었다(Fig. 4). 특히 일본에서 분양받았던 102002를 비롯한 10개의 균주 역시 모두 *C. parasiticum*으로 동정되었다. SC03-14와 102024가 염기서열 한 개의 차이를 보였으나 이 역시 *C. spathiphylli*, *C. ocatum*과는 구분되며, 같은 *C. parasiticum*임을 알 수 있었다. Beta-tubulin 유전자(*tub2*)의 염기서열을 가지고 분석한 Maximum Parsimony와 Neighbor-joining 방법에서도 균주들은 모두 하나의 동일한 종임을 알 수 있었다(Fig. 5). 그러나 β -tubuline gene에 대해서는 다른 genus와의 구별은 가능하였지만, data bank에 *Cylindrocladium*의 *tube2* 유전자의 염기서열이 등록되어 있지 않는 관계로 종 내의 연관관계 분석은 수행하지 않았다. *Colletotrichum gloeosporioides*, *Gibberella fujikuroi*, *Fusarium proliferatum*, *Alternaria brassicicola*, *Gibberella zeae*와 분석결과 이들 중 *Alternaria brassicicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*와 좀 더 유사성을 보였다. 형태적 특징 관찰을 위해서 사용한 SC03-15의 자낭각, 분생포자 및 소낭의 모습은 *Cylindrocladium parasiticum*과 동일하였으며, ITS와 β -tubuline 유전자의

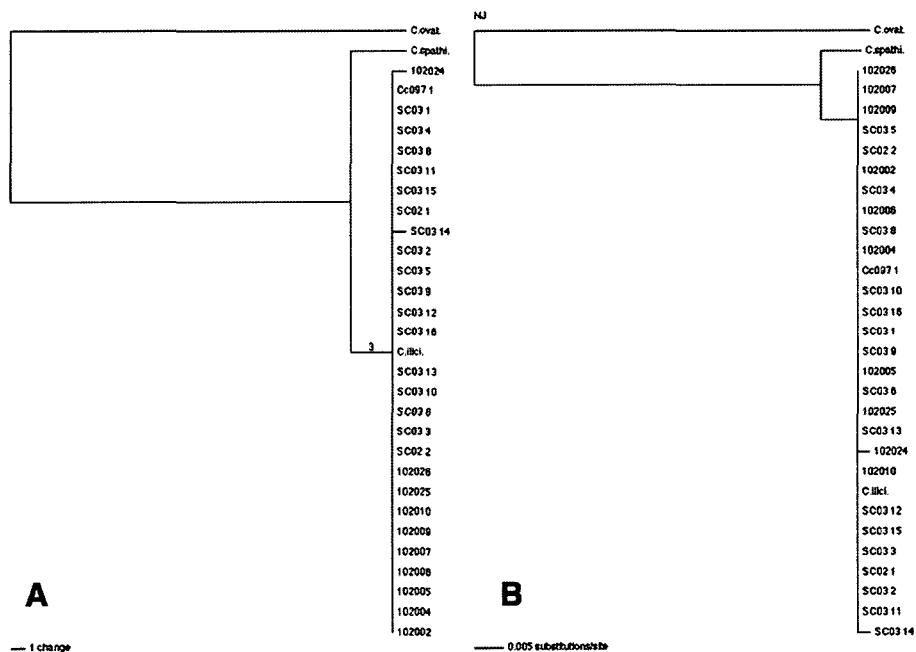


Fig. 4. Phylogenetic relationships of the *Cylindrocladium* spp. with ITS resion sequences. **A**: The most parsimonious tree derived from maximum parsimony analysis. **B**: Phylogenetic tree based on neighbor-joining analysis. C. ovata and C. spathiphylli was indicated as C. ovatum and C. spathiphylli.

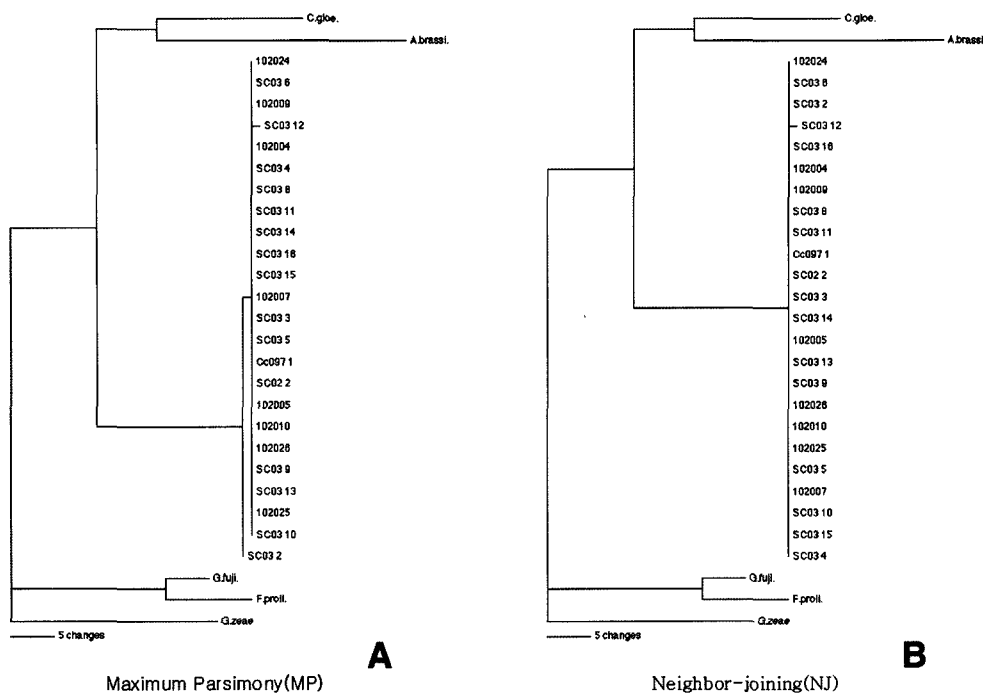


Fig. 5. Phylogenetic relationships of the *Cylindrocladium* spp. with tubuline gene sequences. **A:** The most parsimonious tree derived from maximum parsimony analysis. **B:** Phylogenetic tree based on neighbor-joining analysis. Each abbreviation from the top represented *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata*, *Gibberella fujikuroi*, *Fusarium proliferatum* and *Gibberella zeae* as the out group, respectively.

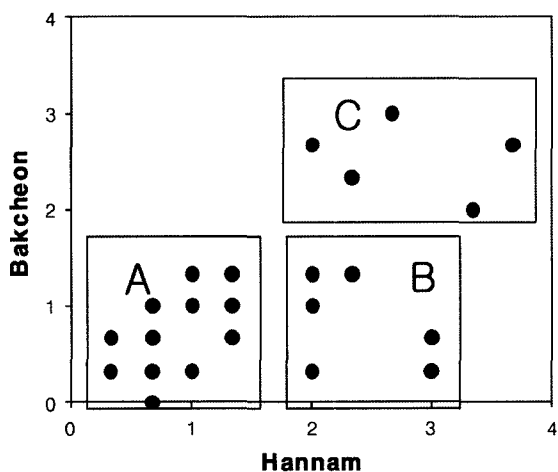


Fig. 6. Pathogenicity of *Calonectria ilicicola* (*Cylindrocladium parasiticum*) isolates against soybean cv. 'Hannam' and 'Bakcheon' by wound inoculation method. Group A showed the low pathogenicity was included as 14 isolates such as 102002, 102004, 102006, 102007, 102010, Cc097-1, SC02-1, SC02-2, SC03-1, SC03-5, SC03-8, SC03-9, SC03-10, and SC03-11. Group B showed with the strong pathogenicity against only Hannam cultivar was included 8 isolated as 102005, SC03-3, SC03-6, SC03-7, SC03-12, SC03-13, SC03-15, and SC03-16. Group C included as 102009, 102024, SC03-2, SC03-4, and SC03-14 showed the strong pathogenicity against both of all cultivar of soybean, 'Bakcheon' and 'Hannam'.

염기서열을 분석하여 실시한 분자 동정의 결과와도 일치하였다.

지제부 상처접종법을 이용한 병원성 검정. 지제부 상처접종법을 사용하여 분리한 균주들에 대한 병원성을 검정하였다. 각 균주들은 반복간에 균일한 병원성을 나타내었으며, 콩의 품종에 대해서는 병원성에 차이가 있었다. Fig. 6에서 보는 것과 같이 29 균주는 세 그룹으로 구분할 수 있었다. A 그룹(102002, 102004, 102006, 102007, 102010, Cc097-1, SC02-1, SC02-2, SC03-1, SC03-5, SC03-8, SC03-9, SC03-10, SC03-11)은 '한남'과 '백천' 모두에 낮은 병원성을 보였으며, 두 번째 그룹인 B(102005, SC03-3, SC03-6, SC03-7, SC03-12, SC03-13, SC03-15, SC03-16)는 '한남'에는 병원성이 강하지만, '백천'에서는 병 발생이 낮은 병원균으로 구분되었다. C 그룹(102009, 102024, SC03-2, SC03-4, SC03-14)은 두 품종 모두에 대해서 강한 병원성을 보이는 균주임이 밝혀졌다. 실험에 사용한 '백천'은 검은뿌리썩음병균에 대해서 저항성 품종으로 알려져 있지만, 본 실험의 결과 국내에서 분리한 SC03-2, SC03-4, SC03-14 등 세 균주는 저항성 품종으로 분류되는 백천에도 병원성을 나타내고 있기 때문에, 저항성 품종을 육종하기 위한 병원성 실험에 사용할 균주의

선발에 주의해야 할 것으로 생각한다.

요 약

2002년과 2003년 중부 이남의 콩 재배지에서 지상부에 황화 증상을 보이며, 지제부에 붉은 색의 자낭각이 형성된 콩을 채집하여 검은뿌리썩음병균을 분리하였다. 분리한 병원균으로부터 유성세대의 자낭각, 자낭, 자낭포자를, 무성세대의 분생포자와 소낭을 관찰하였다. 자낭각의 크기는 $357.9(312.5\sim391.5.7)\times 474.3(419\sim535)$ μm 로 적갈색의 구형 또는 난형이었으며, 자낭(크기; 90.9×15.0 μm)은 무색투명한 곤봉상의 모양을 나타내고 있었다. 자낭 안에 8개의 자낭포자가 형성되었는데, 무색투명하며 1-3개의 격벽을 지닌 약간 굽은 긴 형태로 크기는 $36.87(31.1\sim49.4)\times 5.22(4.5\sim6.1)$ μm 이었다. 무성생식세대에서 만드는 분생포자는 긴 원통형이며 색깔은 투명하고, 크기는 $73.24(68.1\sim77.6)\times 5.76(4.9\sim6.8)$ μm 로 자낭포자보다 컸다. 소낭의 모양은 둥근 모양이며 크기는 지름이 $8.46(6.2\sim10.0)$ μm 로 관찰되었으며, 이는 Crous의 결과와 일치하였다. ITS와 β -tubuline 유전자의 염기서열을 조사하여 phylogenetic analysis를 수행한 결과, 국내에서 분리한 18개의 병원균과 일본에서 분양받은 10개의 병원균 모두 *Cylindrocladium parasiticum*으로 동정되었다.

감사의 글

본 연구 결과는 농촌진흥청의 Biogreen21 연구과제로 지원받은 과제로 수행된 것으로 본 논문을 발표하는 자리를 빌려 감사를 표합니다.

참고문헌

- Berner, D. K., Berggren, G. T., Pace, M. E., White, E. P., Gershey, J. S., Freedman, J. A. and Snow, J. P. 1986. Red crown rot: now a major disease of soybeans. Louisiana. Agriculture 29: 4-5.
- Crous, P. W. 2002. Anamorph and holomorph names. In *Taxonomy and pathology of Cylindrocladium (Calonectria) and Allied Genera*, ed. by P. W. Crous, pp. 1-21. APS press, Minnesota, USA.
- Crous, P. W., Wingfield, M. J. and Alfenas, A. C. 1993. *Cylindrocladium parasiticum* sp. nov., a new name for *C. crotalariae*. Mycol. Res. 97: 889-896.
- Du, M., Schardl, C. L., Nuckles, E. M. and Vaillancourt, L. J. 2005. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. Mycologia 97: 641-658.
- Glenn, D. L. 2001. Incidence and Management of Seed Transmission of *Cylindrocladium* Black Rot of Peanut in Virginia. Masters thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, 60 pp.
- Hermosa, M. R., Keck, E., Chamorro, I., Rubio, B., Sanz, L., Vizcaino, J. A., Grondona, I. and Monte, E. 2004. Genetic diversity shown in Trichoderma biocontrol isolates. Mycol. Res. 108: 897-906.
- Kang, J., Crous, P. W. and Schochi, C. L. 2001. Species concepts in the *Cylindrocladium floridanum* and *Cy. spathiphylli* complexes (*Hypocreaceae*) based on multi-allelic sequence data, sexual compatibility and morphology. System. Appl. Microbiol. 24: 206-217.
- Kucharek, T. 2000. *Cylindrocladium* Black Rot (CBR) of Peanut, Soybean, and Forage Legumes in Florida. Plant Pathology Fact Sheet pp. 139. University of Florida.
- Peres, N. A. R., Souza, T. L., Peever, T. L. and Timmer, L. W. 2004. Boenomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. Plant Dis. 88: 125-130.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315-322. In: PCR Protocols. A guide to methods and applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand and J. J. Sninsky, eds. Academic press, San Diego, CA.
- 김용욱, 조준형. 2005. 국내 육성 콩 품종의 논 재배에 따른 생육 반응과 수량성. 韓作詩. 50: 161-169.
- 아리하라 조우지. 2002. 콩의 생리적 특성 및 일본의 콩 논재배 기술. 한국콩연구회지. 19: 15-23.
- 윤성탁, 주용하. 2002. 경기북부지역에 잘 적응하는 콩 품종 선발. 韓作詩. 15: 309-317.