

# *Raffaelea quercus-mongolica*와 *Raffaelea* spp. 인공접종에 의한 신갈나무 줄기에서의 병원성 평가

## Assessment of Virulence of *Raffaelea quercus-mongolica* and *Raffaelea* spp. Isolates by Artificial Inoculation of *Quercus mongolica* Logs

손수연 · 서상태\* · 박형철

국립산림과학원 산림병해충연구과

**\*Corresponding author**

Tel : +82-2-961-2667

Fax : +82-2-961-2679

E-mail: stseo@forest.go.kr

**Su-Yeon Son, Sang-Tae Seo\* and Hyung-Cheol Park**

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

The objective of this study was to evaluate the virulence of geographically different isolates of oak wilt pathogen, *Raffaelea quercus-mongolica* and other *Raffaelea* species. In this study, mature trees of *Quercus mongolica* were inoculated with the various isolates of *Raffaelea* spp. and their virulence was evaluated by measuring the extent of sapwood discoloration resulting from the inoculation. The average length of discolored sapwood in a lateral direction was longest in the trees inoculated with the isolates from Korea (8.69 cm) followed by *R. quercivora* (7.51 cm) and the other *Raffaelea* spp. (3.35 cm). The lateral length of discolored sapwood caused by the inoculation with Korean strains varied from 4.71 to 14.90 cm indicating their differences in virulence. The area of discolored sapwood caused by the inoculation with *Raffaelea* spp. varied from 1.57 to 8.42 cm<sup>2</sup> indicating their differences in virulence. Based on the length and area of the discolored sapwoods, isolated YY and wj43 appeared to have the highest virulence among all the *Raffaelea* isolates tested. Each of the two isolates was obtained from Gangwon Province and Jeonbuk Province, respectively.

**Keywords :** Inoculation, Oak wilt, *Raffaelea quercus-mongolica*

Received August 12, 2014

Revised October 7, 2014

Accepted October 31, 2014

### 서 론

참나무류는 낙엽활엽수림의 대표적인 수목으로서, 우리나라 수종들 중에서 종의 점유면적 및 축적량이 상위인 10개 수종 중 신갈나무, 굴참나무, 상수리나무, 졸참나무, 갈참나무 등이 포함되어 있으며, 이 5개 수종의 점유비율이 무려 63.9%에 이른다(Korea Forest Research Institute, 2012). 참나무류는 우리 주

위에서 가장 흔히 볼 수 있고 쓰임새가 다양하여 귀중한 자원으로 다루어져야 할 것이다.

현재 참나무류의 쇠퇴 및 병에 의한 고사피해가 전 세계적으로 발생되고 있으며, 집단적인 고사피해를 일으켜 문제가 되고 있는 병해는 크게 3종류가 있다(Kim, 2007). 미국 및 유럽에서는 *Ceratocystis fagacearum*에 의한 참나무시들음병(oak wilt)과 *Phytophthora cinnamomi*에 의한 급사병(sudden oak death)의 피해가 심각한 것으로 보고되어 있으며(Brasier, 1996; Juzwik 등, 2011), 일본에서는 *Raffaelea quercivora*에 의한 참나무류의 집단고사가 발생하여 문제가 되고 있다(Kusumoto 등, 2012; Kubono와 Ito, 2002; Murata 등, 2005; 2007).

#### Research in Plant Disease

©The Korean Society of Plant Pathology

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

우리나라에서는 2004년 경기도 일원에서 참나무류 집단 고사현상이 처음 발견되었고, 국내 전역에 걸쳐 빠르게 확산되어 2007년도에는 경기도, 강원도, 전라북도의 천공목율이 가장 높게 나타났으며, 이후 다양한 연구에 의해서 병원균은 *R. quercus-mongolicae*로 최종적으로 동정되었다(Kim, 2009; Korea Forest Research Institute, 2010). 참나무시들음병은 광릉긴나무좀 (*Platypus koryoensis*)과 *Raffaelea* sp.와의 공생관계에 의해 발생하며(Korea Forest Research Institute, 2007; 2010), 이러한 메커니즘은 일본의 참나무시들음병과 유사하다(Hong 등, 2006).

일본에서는 병원성을 검정하는 연구가 다양하게 진행되고 있고(Murata 등, 2005; 2007), 국내 또한 병원성 검정을 시도하고 있으나 병원성 검정이 효과적으로 나타나지 않았다(Korea Forest Research Institute, 2010; Torii 등, 2014).

이 연구는 병원성 검정연구에 앞서 균주간의 참나무시들음병 병원성을 간접적으로 확인하기 위하여 감수성이 높은 신갈나무에 *R. quercus-mongolicae* 및 *Raffaelea* spp.를 접종하고, 목재 내의 균사 생장으로 인해 생성된 변색 부위의 크기 및 면적을 비교 분석하였다.

### 재료 및 방법

**공시균주.** 본 연구에서는 국내균주 *R. quercus-mongolicae* 12개와 국내 및 국외의 *Raffaelea* spp. 10균주를 사용하였다(Table 1). 각각의 균주들은 25°C 암 조건에서 7일간 PDA 배지 (potato dextrose agar, Difco Co.)에 배양하였으며, 균이 자란 배지를 멸균 핀셋으로 으개서 1.5 ml tube에 옮겨 담은 뒤 다시 일주일 배양하였고, 배양된 균주는 접종원으로 인공접종에 사용하였다.

**병원균의 인공접종.** 2013년 5월 15일 강원도 춘천시 소재의 신갈나무 임지에서 흉고 직경이 26 cm이고 광릉긴나무좀의 침입공 흔적이 없는 신갈나무 3그루를 선발하여 벌목하였으며, 접종 및 보관에 용이하도록 1 m 길이로 단목별 2개씩 제작하

였다. 절단된 신갈나무는 70% 알코올로 표면살균을 한 뒤 줄기 내의 수분이 손실되지 않도록 양쪽 단면을 바셀린(Vaseline)으로 처리하였다. 그 후 Murata 등(2005)이 접종에 사용한 방법을 응용하여 절단된 단면으로부터 10 cm 위를 접종 시작점으로 20 cm 간격으로 접종을 하였으며, 접종 라인 당 일정한 간격으로 6개씩 일정한 간격을 두고 총 30개의 접종구(직경 0.8 cm, 깊이 2 cm)를 제작하였다. 또한 각 줄기 둘레의 접종구는 생장이 겹치지 않도록 어긋나게 하였다(Fig. 1). 각 간격의 6개 접종

Table 1. *Raffaelea* sp. isolates used in this study

Isolate	Species	Location
RA12309	<i>R. quercivora</i>	Japan
RA12355	<i>R. quercivora</i>	Japan
RA12363	<i>R. quercivora</i>	Japan
RA12457	<i>R. quercivora</i>	Japan
RA410918	<i>R. quercivora</i>	Japan
RA410920	<i>R. quercivora</i>	Japan
CBS168.66	<i>R. canadensis</i>	Canada
CBS185.64	<i>R. ambrosia</i>	England
CBS271.70	<i>R. albimanens</i>	South Africa
JHP26	<i>Raffaelea</i> sp.	Seoul, Korea
JHP16	<i>R. quercus-mongolicae</i>	Seoul, Korea
RS10-1	<i>R. quercus-mongolicae</i>	Gyeonggi, Korea
RS12-3	<i>R. quercus-mongolicae</i>	Gyeonggi, Korea
RS25-2	<i>R. quercus-mongolicae</i>	Seoul, Korea
RS32-1	<i>R. quercus-mongolicae</i>	Gangwon, Korea
YY	<i>R. quercus-mongolicae</i>	Gangwon, Korea
RQ9.3501	<i>R. quercus-mongolicae</i>	Chungbuk, Korea
gh09	<i>R. quercus-mongolicae</i>	Chungnam, Korea
wj43	<i>R. quercus-mongolicae</i>	Jeonbuk, Korea
SC	<i>R. quercus-mongolicae</i>	Jeonnam, Korea
RQ9.7102	<i>R. quercus-mongolicae</i>	Gyeongbuk, Korea
hc0903	<i>R. quercus-mongolicae</i>	Gyeongnam, Korea

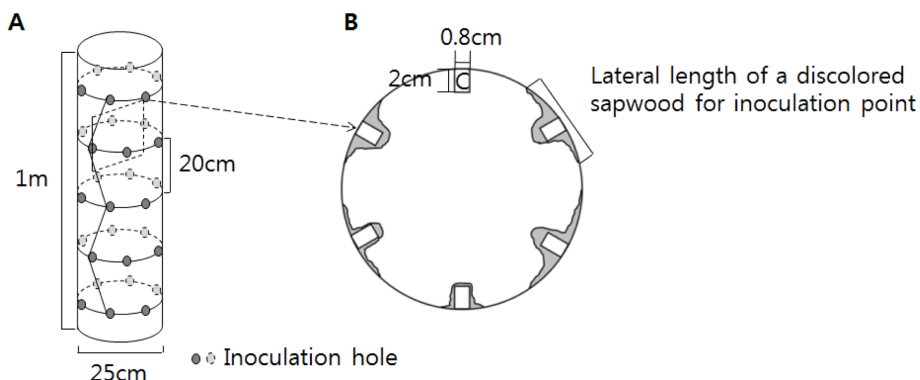


Fig. 1. Schemes for log inoculation (A) and sapwood discoloration measurement (B).

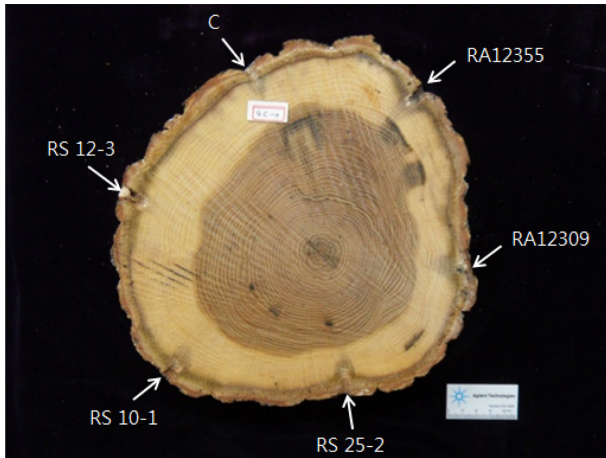


Fig. 2. Discolored sapwood on a *Q. Mongolica* cross-section five weeks after inoculation with *Raffaelea quercus-mongolicae*, other *Raffaelea* spp., and control.

원 중 1개씩은 대조구(control)로 선정하여 PDA 배지를 접종하였으며, 나머지 5개의 접종구에는 각각의 균주들을 0.8 g 씩 접종하였다. 수분 유지 및 오염을 방지하기 위하여 멸균된 8 mm Paper disc에 멸균수를 흡수시킨 뒤, 접종구에 삽입하고 바셀린으로 처리하였다. 접종 후에는 통나무 전체를 랩을 이용하여 밀봉하고 미리 제작된 아크릴 케이스(직경 30 cm, 높이 1.2 m)에 넣어 밀폐시킨 후 항온실에서 25°C, 암 조건으로 5주 동안 배양하였다. 실험은 접종 대상목의 성장 상태에 따라 균 생장의 편차가 다를 것을 대비하여 3반복으로 진행 하였다.

**변색부위의 측정 및 통계분석.** 항온실에서 5주간 배양시킨 절단된 신갈나무 줄기는 각 20 cm 간격의 접종부위를 목공기계 띠톱 제재기(Holytex Co. SBW-5300)를 이용하여 절단하였으며, 절단면의 사진을 촬영하고 ImageJ 1.48v program (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)을 이용하여 형성층을 기준으로 변색된 측면의 길이와 변색된 부위의 면적을 측정하였다(Fig. 1, Fig. 2). 그리고 병원균들이 수목에 미친 일반적 특성을 통계분석프로그램 SAS(SAS 9.4, SAS Institute Inc., USA)를 이용하여 Tukey's Studentized Range(HSD) test를 통하여 사후검정 분석하였다.

## 결과 및 고찰

*Raffaelea quercus-mongolicae* 및 *Raffaelea* spp.를 신갈나무 줄기에 인공접종하여 5주 경과 후 변색된 접종 부위의 측면 길이를 ImageJ 1.48v program을 이용하여 측정하고 SAS로 Tukey's Grouping을 한 결과, Table 2와 같이 신갈나무에 대하여 각 균주들이 유의한 차가 있는 것으로 나타났다. 각 균주별에 따라 변색부위의 길이에 차이가 있었는데( $F = 6.47$ ,  $p = 0.0001$ ) wj43(전라북도)이 14.90 cm로 변색부위가 가장 크게

나타났고, CBS 185.64(*R. ambrosia*)는 1.64 cm로 가장 낮게 나타났다. Tukey 사후 검정결과 Control, gh09(충청남도), CBS 168.66(*R. canadensis*), CBS 185.64(*R. ambrosia*) 균주는 wj43(전라북도) 균주와 YY(강원도) 균주와 병원성 차이가 있는 것으로 나타났으며, 나머지 균주들은 차이가 거의 없는 것으로 나타났다(Table 2).

각 균주에 따라 변색부위의 면적 또한 차이가 있었는데( $F = 7.02$ ,  $p = 0.0001$ ) wj43(전라북도)이 8.42 cm<sup>2</sup>로 변색면적 값이 가장 컸으며, CBS 185.64(*R. ambrosia*)는 1.57 cm<sup>2</sup>로 가장 면적이 작게 나타났다. Tukey 사후 검정결과 Control과 CBS 185.64(*R. ambrosia*), CBS 271.70(*R. albimanens*) 균주는 RA410920, YY(강원도), wj43(전라북도), RQ9.7102(경상북도), hc0903(경상남도) 균주들과 병원성 차이가 있는 것으로 나타났으며, 나머지 균주들은 차이가 거의 없는 것으로 나타났다(Table 2).

변색된 측면의 총 평균 길이 값은 국내에서 분리된 *R. quercus-mongolicae* 균주들이 8.69 cm로 7.51 cm인 일본 균주와 3.35 cm인 기타 *Raffaelea* 속 근연종 균주의 평균 길이 값보다 컸으며, 변색된 면적의 총 평균값은 일본 균주들이 5.97 cm<sup>2</sup>를 나타내어 기타 *Raffaelea* 속 근연종 균주 1.79 cm<sup>2</sup>와 국내에서 분리된 균주 5.57 cm<sup>2</sup>보다 높은 값을 나타냈다.

이와 같이 접종 그룹 별로 변색 길이와 면적의 총 평균값이 서로 비례하지 않는 이유는 일본 균주들의 측면 변색 값과 변색부 변색 면적 값 비율보다 국내 *R. quercus-mongolicae* 균주들 값의 비율 차가 더 크기 때문이다. 이와 같이 각 균주들의 길이와 면적 값이 비례하지 않는 결과는 Murata 등(2007)이 6종의 참나무류 수종에 *R. quercivora*를 접종한 실험의 결과와 일치하며, *Q. serrata* 줄기에 *R. quercivora* 5개를 접종했을 때 각기 변색 길이가 다르게 나타난 Kusumoto 등(2012)의 보고와도 일치하였다. 또한 Korea Forest Research Institute(2010)에서 일본균주와 한국균주를 각각 3개씩 선택하여 접종 후 관찰한 결과 일본과 한국 균주간의 균주별 변색크기의 차이가 다르게 나타난 결과와도 일치 하였다. 한편 변색된 부위에서 접종균을 재분리 한 결과 분리율이 100% 였으며, Control 변색부위에서는 *Raffaelea*가 분리되지 않았다. 이는 Torii 등(2014)이 접종 후 재분리 결과 Control에서 *Phomopsis* spp.와 *Trichoderma* spp.가 분리 되었으며, *R. quercus-mongolicae*가 분리되지 않은 결과와 일치하였다.

본 연구에서는 국내에서 분리된 균주들 중에서 YY(강원도), wj43(전라북도), RQ9.7102(경상북도), hc0903(경상남도) 균주가 길이 값이 8 cm 이상이면서 면적 값이 6 cm<sup>2</sup>로 가장 많은 변색을 보여 다른 지역들의 분리 균주들보다 병원성이 더 높은 것으로 사료된다. 한편 YY와 wj43 균주는 Seo 등(2010)이 보고한 지역별 *Raffaelea* spp.의 유전적 분류 실험에서 같은 그룹에 속해 있었는데, 본 실험에서도 변색길이와 변색면적의 Tukey 검정을 통하여 YY와 wj43가 다른 균주들과 차이가 있었고 병원성

Table 2. Average lateral length and average area of discolored sapwood by inoculum ( $p < 0.0001$ ,  $F = 6.47$ )

Isolate	Lateral length (cm)		Area (cm <sup>2</sup> )	
	mean ± S.E.	Tukey's*	mean ± S.E.	Tukey's*
RA12309	6.58 ± 0.38	b ↔ e	4.72 ± 0.33	a ↔ d
RA12355	6.35 ± 0.40	b ↔ e	4.27 ± 0.12	a ↔ d
RA12363	6.19 ± 1.80	b ↔ e	5.69 ± 0.58	a ↔ d
RA12457	8.60 ± 0.52	a ↔ e	6.33 ± 0.30	a ↔ d
RA410918	7.56 ± 0.11	a ↔ e	7.00 ± 1.07	a ↔ c
RA410920	9.75 ± 0.67	a ↔ d	7.83 ± 1.62	a
CBS168.66	3.29 ± 1.35	d ↔ e	2.36 ± 0.78	b ↔ d
CBS185.64	1.64 ± 1.34	e	1.57 ± 0.53	c ↔ d
CBS271.70	4.35 ± 1.88	c ↔ e	1.91 ± 0.50	c ↔ d
JHP26	4.10 ± 1.67	c ↔ e	2.03 ± 0.64	b ↔ d
JHP16	7.88 ± 0.67	a ↔ e	6.00 ± 0.82	a ↔ d
RS10-1	7.34 ± 1.37	a ↔ e	4.30 ± 0.41	a ↔ d
RS12-3	6.38 ± 0.61	b ↔ e	3.45 ± 0.60	a ↔ d
RS25-2	4.99 ± 1.07	c ↔ e	2.37 ± 0.55	b ↔ d
RS32-1	8.34 ± 1.45	a ↔ e	5.80 ± 0.47	a ↔ d
YY	13.55 ± 1.28	a ↔ b	7.42 ± 0.81	a ↔ b
RQ9.3501	8.31 ± 1.30	a ↔ e	4.72 ± 0.73	a ↔ d
gh09	4.71 ± 1.16	d ↔ e	3.44 ± 0.44	a ↔ d
wj43	14.90 ± 1.57	a	8.42 ± 2.59	a
SC	7.01 ± 1.31	a ↔ e	4.43 ± 0.62	a ↔ d
RQ9.7102	8.94 ± 0.25	a ↔ e	8.14 ± 0.76	a
hc0903	11.89 ± 2.53	a ↔ c	8.39 ± 0.58	a
Control	2.49 ± 0.55	d ↔ e	1.23 ± 0.33	d

\*Tukey's Studentized Range (HSD) test at the significant level of  $\alpha = 0.05$ .  
 ↔: significantly different in post-hoc tests.

또한 가장 높게 나타났다. 하지만 hc0903의 경우 유전적으로 다른 그룹에 있으므로 이는 Tukey 검정에서 길이의 그룹과 면적의 그룹이 일치하지 않아 차이가 있는 것으로 사료된다.

정확한 유전관계를 얻기 위해서는 계속해서 유전적 연구와 병원성 검정 연구가 함께 이루어져야 하고, 병원성 검정을 할 때 상대적으로 변색이 많이 된 병원균을 이용하면 보다 좋은 결과를 얻을 수 있을 것이라 사료되며, 더 정확한 병원성 검정 연구를 위해서는 야외의 입목에 접종하여 시들음 정도와 줄기의 막힘 정도를 비교분석하는 연구가 필요할 것이다.

### 요 약

본 연구의 목적은 신갈나무에서 참나무시들음병 병원균인 *Raffaelea quercus-mongolicae*의 지역별 균주와 기타 *Raffaelea* 속 근연종의 병원성을 평가하는 것이다. 이 연구에서는 신갈나무에 다양한 균주를 접종한 후, 변재부 내 변색정도로 각 균주의 병원성을 판단하였다. 그 결과 변색부의 평균 측면 확산

정도는 국내에서 분리한 *Raffaelea quercus-mongolicae* 병원균 (8.69 cm)이 일본 병원균(7.51 cm)이나 기타 *Raffaelea* 속 근연종(3.35 cm)의 평균보다 높았고, 국내 지역별 *Raffaelea quercus-mongolicae* 균주간에는 변색부 측면 확산정도가 4.71–14.90 cm로 병원성의 차이를 보였다. 균주간의 변색부 면적 확산정도는 1.57–8.42 cm<sup>2</sup>로 서로 다른 병원성의 차이를 보였으며, 가장 높은 병원성은 강원도에서 분리한 YY와 전라북도에서 분리한 wj43에서 나타났다.

### References

Brasier, C. M. 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Ann. Forest Sci.* 53: 347–358.  
 Hong, K. J., Kwon, Y. D., Park, S. W. and Lyu, D. P. 2006. *Platypus koryoensis* (Murayama) (Platypodidae; Coleoptera), the Vector of Oak Wilt Disease. *Korea J. Appl. Entomo.* 45: 113–117.  
 Juzwik, J., Appel, D. N., MacDonald, W. L. and Burks, S. 2011. Chal-

- lenges and Successes in Managing Oak Wilt in the United States. *Plant Dis.* 95: 888–900.
- Kim, K. H. 2007. Status of oak wilt disease and the measures. *Korea Tree Health Association*. 12: 12–20.
- Kim, S. W., Kim, K. S., Lamsal, K., Kim, Y. J., Kim, S. B., Jung, M. J., Sim, S. J., Kim, H. S., Chang, S. J., Kim, J. K. and Lee, Y. S. 2009. An In vitro study of the antifungal effect of silver nanoparticles on Oak Wilt Pathogen *Raffaelea* sp.. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 760–764.
- Korea Forest Research Institute, 2007. Report of Monitoring for Forest Insect Pests and Diseases in Korea. 148 p.
- Korea Forest Research Institute, 2010. Ecology and control research of oak wilt disease. 122 p.
- Korea Forest Research Institute. 2012. Economic tree species 2. Oak Tree. 210 p.
- Kubono, T. and Ito, S. 2002. *Raffaelea quercivora* sp. nov. associated with mass mortality of Japanese oak, and the ambrosia beetle (*Platypus quercivorus*). *Mycoscience* 43: 255–260.
- Kusumoto, D., Hayato, M., Kazuya, O. and Naoto, K. 2012. Virulence of *Raffaelea quercivora* isolates inoculated into *Quercus serrata* logs and *Q. crispula* saplings. *J. Forest Res.* 17: 393–396.
- Murata, M., Yamada, T. and Ito, S. 2005. Changes in water status in seedlings of six species in the Fagaceae after inoculation with *Raffaelea quercivora* Kubono et Shin-Ito. *J. Forest Res.* 10: 251–255.
- Murata, M., Yamada, M., Matsuda, Y. and Ito, S. 2007. Discoloured and non-conductive sapwood among six *Fagaceae* species inoculated with *Raffaelea quercivora*. *Forest Pathol.* 37: 73–79.
- Seo, S. T., Kim, K. H., Lee, S. H., Kwon, Y. N., Shin, C. H., Kim, H. J. and Lee, S. Y. 2010. Genotypic characterization of Oak Wilt Pathogen *Raffaelea quercus-mongolicae* and *R. zuercivora* Strains. *Plant Dis.* 16: 219–223.
- Torii, M., Matsuda, Y., Seo, S. T., Kim, K. H., Ito, S., Moon, M. J., Kim, S. H. and Yamada, T. 2014. The Effect of *Raffaelea quercus-mongolicae* inoculation on the formation of Non-conductive sapwood of *Quercus mongolica*. *Mycobiology* 42: 210–215.