

훈증방제 처리한 참나무시들음병 감염목의 사상균 조사

서동연¹ · 손승렬¹ · 김성환^{1*} · 서상태² · 김경희² · 고한규³

¹단국대학교 미생물학과, ²국립산림과학원, ³산림조합중앙회 산림버섯연구소

Investigation of Fungi in Pesticide Fumigated Oak Wilt-Diseased Logs

Dong Yeon Suh¹, Seong-Yeol Son¹, Seong Hwan Kim^{1*}, Sang Tae Seo², Kyung Hee Kim² and Han Kyu Ko³

¹Department of Microbiology and Institute of Basic Sciences, Dankook University, Cheonan, Chungnam 330-714, Korea.

²Division of Forest Insect Pests and Diseases, Korea Forest Research Institute, Korea Forest Service, Seoul 130-712, Korea

³Forest Mushroom Research Center, National Forestry Cooperative Federation, Yeosu 469-803, Korea

(Received 15, November 2012., Revised 2, December 2012., Accepted 11, December 2012)

ABSTRACT: Korean oak wilt disease caused by *Raffaelea quercus-mongolicae* is vectored by the ambrosia beetle *Platypus koryoensis*. To prevent the spread of the disease, the beetle infested oak tree had been cut into logs, covered with plastic vinyl, fumigated with a pesticide, and stored for three years on the site where the tree was cut. This study was carried out to get information on the fungi colonizing the fumigated oak wood. Wood disk samples collected from the fumigated oak logs at two locations in the Taejo Mountain, Cheonan city, were used for fungal isolation. A total of 99 filamentous fungal isolates were obtained from the wood disk samples. *Hypocrea* spp., *Trichoderma* spp. and *Penicillium* spp. were identified based on morphological characteristics and nucleotide sequence analysis of translation elongation factor 1-alpha gene and ITS rDNA region. *Trichoderma* was the major fungal group. *R. quercus-mongolicae*, and *P. koryoensis* were not detected from the fumigated oak wood. Our work provided evidence that after three years of storage, the fumigated oak wilt-diseased logs should be no longer harmful source of oak wilt disease transmission.

KEYWORDS : Fungal flora, Fumigation, Oak wilt disease, *Platypus koryoensis*, *Raffaelea quercus-mongolicae*

국내의 참나무시들음병은 매개충인 광릉긴나무좀(*Platypus koryoensis*)과 병원균인 *Raffaelea quercus-mongolicae*간의 공생작용에 의해 발병되는 것으로 보고된 병이다(Kim et al., 2009). 이병은 전국 82개 시군구에서 발병하였고 그로 인한 참나무 피해는 매년 증가하고 있는 추세이다. 최근에는 서울, 경기도를 중심으로 도심권 공원에 발병하여 산에서 도심지로 병이 확산되는 추세에 있다. 이병은 주로 갈참나무, 신갈나무, 졸참나무에 많은 피해를 주었고 상수리나무, 굴참나무, 떡갈나무까지 그 피해가 알려지고 있다. 참나무시들음병이 발병하게 되면 방제처리를 하게 되는데 끈끈이트랩, 벌채훈증, 벌채소각, 살충제 나무주사 등 여러 방법들이 복합적으로 사용된다. 이 중에 벌채훈증이 가장 많이 이용되는데 이 방법은 참나무시들음병에 감염된 나무를 1 m 길이로 잘라 비닐로 밀봉하고 메탐소디움으로 훈증하여 일정기간 방치하는 방법이다. 메탐소디움은 매개충을 살충하고 동시에 병원균인 *Raffaelea quercus-mongolicae*에도 살균 효과를 가지고 있어서 선호되는 화학약제이다. 최근 참나무시들음병이 발생한 곳의

위치가 산의 산책로 주변을 포함하여 공원주변에까지 이르고 있는 바 메탐소디움을 훈증 처리하고 방치된 참나무 원목을 일반인들이 쉽게 볼 수 있다. 산책로는 사람들이 많이 왕래를 하는 장소로서 훈증 처리된 모습은 외관으로 보기에 좋지 않고 또한 훈증 처리한 곳에는 위험표시와 함께 해골마크를 표지하고 있어서 이것을 보는 사람들에게 혐오감이나 불안감을 주는 요소가 되고 있다. 훈증 처리된 감염목의 경우 일정 기간이 지나면 밀봉한 비닐을 벗기고 치워야 하는데 이 때 병원균이나 매개충이 존재할 가능성에 대한 의문이 존재한다. 통례적으로 2년이 지나면 치워도 되는 것으로 판단되고 있으나 아직까지 충남을 비롯한 여러 지역에서 훈증 처리 후 3년 이상 방치된 곳이 많이 존재한다. 국유림이나 사유림에서 발생한 참나무에 대해 2년 이상 지나면 치워도 된다는 설득력 있는 과학적 근거가 현재 국내에서 부재한 실정이다. 따라서 본 연구는 훈증 방제 후 2년이 지나면 안전하게 비닐을 열어 방치할 수 있다는 과학적 근거를 마련하고자 참나무시들음병에 감염된 나무를 벌채훈증한 뒤 3~4년 된 감염목에 병원균이나 매개충이 존재하는지 여부 및 다른 진균이 존재한다면 어떠한 진균이 존재하는지 조사하였다.

*Corresponding author <E-mail : piceae@naver.com>



Fig. 1. Examples of fumigated and stored *Platypus koryoensis* infested and oak wilt diseased logs for 3 years in Taejo Mountain area, Cheonan city. Before taking off the plastic vinyl (A, B) and after taking off the plastic vinyl (C, D).

본 연구를 하기 위해 사용된 시료는 3~4년 전에 천안 입장면 양대리에서 발병하여 벌채 훈증되어진 참나무시들음병 감염목 이었다(Fig. 1). 시료는 수거 당시 훈증처리한 당시 그대로 비닐로 잘 감싸져 있었지만 비닐을 벗겼을 때 이미 나무는 많은 부후를 보이고 있었고 일부는 표면에 갈색 원형의 버섯 자실체도 존재하였으며 손으로 건드려도 쉽게 부스러지는 성향을 보였다. 훈증방제 처리된 목재 중 광릉긴나무좀이 들어갔던 흔적이 있는 원목을 중심으로 10 cm 간격으로 잘라서 나온 나무 디스크를 취하여 지퍼백에 담은 후 실험실로 가져와 나무의 상태 조사 및 진균 분리를 시도하였다. 나무시료 디스크는 표면 살균된 정과 망치를 이용하여 작은 나무 칩 형태로 분쇄하였다. 이때 매개충인 광릉긴나무좀은 심재성으로서 산란갱도 내부에 참나무시들음병균인 *Raffaelea* 균을 전반시키기 때문에 버섯의 자실체가 발생한 껍질부분은 본 조사대상에서 제외하였다. 나무칩을 제작하면서 매개충인 광릉긴나무좀의 존재를 갱도를 따라 꼼꼼히 살폈으나 매개충은 한 마리도 존재하고 있지 않았고 다른 벌레들의 성충 또는 유충이 존재하고 있었다(Fig. 2). 시료로부터 참나무시들음병균인 *Raffaelea*의 분리는 이전에 매개충으로 부터 분리하는 방법에 따라 분리를 시도하였다(Suh *et al.*, 2011). 나무 칩과 채집한 벌레들은 0.5% 락스와 70% ethanol에 각각 2분간 침지하였다가 멸균수에 두 차례 세척하여 표면살균을 시행하였다. 표면 살균된 나무 칩과 벌레를 PDA배지에 올린 후 25°C 배양기에 넣어 3~5일간 배양하였다. 배양 후 자라난 사상균은 접종편을 이용하여 새 PDA배지에 계대 배양하면서 순수 분리를 하였다. 순수 분리된 균주들은 균총 형태와 더불어 광학 현미경(Axioskop 40; Carl Zeiss, Jena, Germany)을 사용하여 포자와 균사를 관찰하여 형태적 특성을 조사하였다.

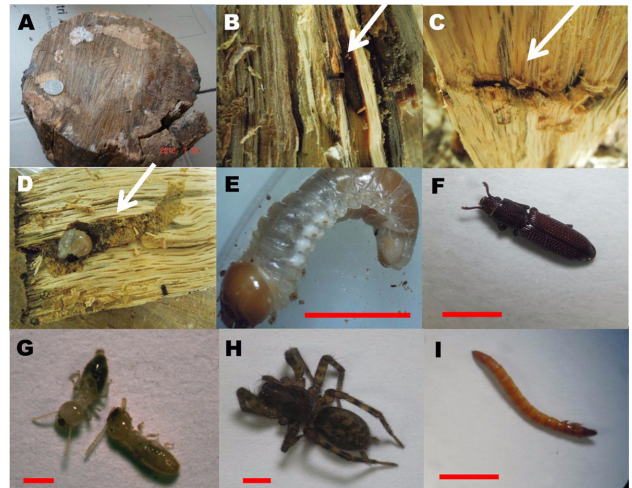


Fig. 2. An example of the samples used for fungal isolation in this study. A: a photo of a fumigated oak wood disk, B-D: galleries of insect (arrow indicated), and images of inside of the wood. E-I: captured insect, spider and larva (scale bar: E = 1 cm, F-I = 1 mm).

분자적 동정을 위해서는 glass bead방법(Richard *et al.*, 2002)을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 얻어진 template DNA를 대상으로 TEF728과 TEF1 프라이머와 ITS1과 ITS4프라이머를 이용하여 PCR을 수행 함으로서 translation elongation factor 1-alpha 코딩 *tefl-α* 유전자 부분과 ITS region 유전자 부분을 증폭하였다(Evidente *et al.*, 2008; White *et al.*, 1990). 증폭한 PCR산물은 1% agarose gel 전기영동으로 증폭된 DNA밴드를 확인 후 gel extraction kit(바이오니아사)를 사용하여 분리한 다음 마크로젠사에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 얻어진 염기서열은 미국 NCBI의 BLAST program(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)을 이용하여 GenBank 데이터베이스에 존재하는 등록된 진균의 염기서열과 유사성을 비교하였다. *Trichoderma*와 *Hypocrea* 속에 속하는 종에 대한 유전자 동정은 추가로 Tricho-BLAST on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy(ISTH, <http://www.isth.info/>) 데이터베이스를 활용하였다.

나무칩과 벌레로부터 사상균 순수분리를 수행한 결과 99균주를 얻을 수 있었다. 형태 관찰과 분자적 방법으로 동정한 결과 *Hypocrea*, *Penicillium*, *Trichoderma* 속에 속하는 종들이 나타났다(Table 1). 이들 균주의 대표적 종에 대한 PDA에 배양된 균총의 모습은 Fig. 3과 같다. 배지상에서 *Hypocrea*와 *Trichoderma* 균들은 대체적으로 푸른색과 노란색을 나타내고 방사상으로 퍼지는 형태를 나타내어 배지상에서의 잘 알려진 *Trichoderma* 균의 일반적특성을 보였다(Fig. 3A-G). *Penicillium* 균은 푸른색을 나타내지 않고 다소 베이지색에 가까운 색과 옅은 파란색을 나타내었다(Fig. 3H-I). 자낭균인 *Hypocrea*는 대부분 불완전균류인 *Trichoderma* 균의 완전세대이므로 Table 1에 나

Table 1. Filamentous fungi isolated from the fumigated oak wilt-diseased logs and insect caught from the fumigated oak logs

Species (representative isolate number)	GenBank accession no.	Fumigated logs	Insect
<i>Hypocrea virens</i> (DUCC 7301)	KC291138	9	2
<i>Hypocrea lixii</i> (DUCC 7302)	KC291139	15	11
<i>Hypocrea lutea</i> (DUCC 7303)	KC291140	6	3
<i>Hypocrea koningii</i> (DUCC 7304)	KC291141	-	4
<i>Trichoderma atroviride</i> (DUCC 7305)	KC291142	3	3
<i>Trichoderma</i> sp. (DUCC 7306)	KC291143	16	9
<i>Trichoderma viride</i> (DUCC 7307)	KC291144	7	2
<i>Penicillium</i> sp.1 (DUCC 7308)	KC291137	6	-
<i>Penicillium</i> sp. 2 (DUCC 7309)	KC291136	6	-
Total		65	34

-: no isolation. Number indicates the number of fungal isolates obtained. DUCC: Dankook University Culture Collection.

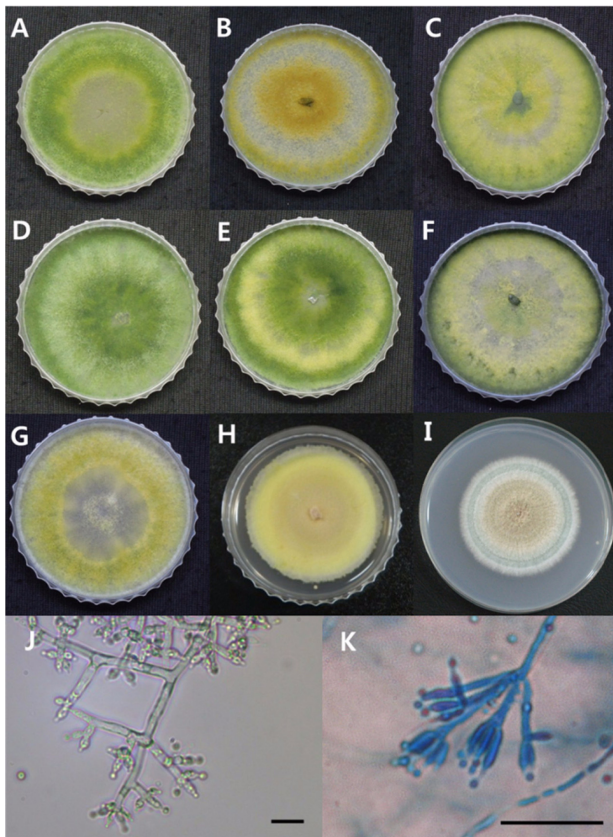


Fig. 3. Colony morphology (A-I) and representative light microscopic images of *Hypocrea* spp. (anamorph *Trichoderma*) (J) and *Penicillium* spp. (K) isolated from this study. A: *Hypocrea koningii*, B: *Hypocrea lutea*, C: *Hypocrea lixii*, D: *Hypocrea virens*, E: *Trichoderma atroviride*, F: *Trichoderma viride*, G: *Trichoderma* sp., H: *Penicillium* sp. 1, I: *Penicillium* sp. 2, J: conidiophores and conidia of *Trichoderma* sp. DUCC 7306 (scale bar = 10 μ m), K: conidiophores and conidia of *Penicillium* sp. 2 DUCC 7309 (scale bar = 10 μ m).

타난 진균 종의 대부분이 사실은 *Trichoderma* 균임을 알

수 있다(Overton *et al.*, 2006; Samuels *et al.*, 2006). 따라서 Fig. 3J에 관찰된 분생자경과 분생포자의 이미지는 동정된 *Hypocrea* 와 *Trichoderma* 종 모두에 공통적으로 유사하게 존재하였다. 이들 *Hypocrea*와 *Trichoderma* 균은 현미경 관찰만을 통하여 동정이 매우 어려운 종이다. 이에 따라 분자적 방법으로 이들 종을 전문으로 동정하는 데이터베이스인 Tricho-BLAST on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy(ISTH, <http://www.isth.info/>)를 활용하여 동정을 마무리하였다. 동정에 사용된 *tefl- α* 유전자는 GenBank DNA 데이터베이스에 등록하였다(Table 1). 분자적으로 동정된 *Hypocrea* 종들은 본 연구에 사용한 인공배지상에서 자낭을 형성하지 않았고 불완전 세대의 모습만 나타내었다. Fig. 3K에 나타난 이미지를 보인 *Penicillium* 균의 경우는 ITS rDNA 분석을 통하여 서로 다른 *Penicillium* sp. 1과 *Penicillium* sp. 2임을 확인하였고 분석된 염기서열 또한 GenBank DNA 데이터베이스에 등록하였다(Table 1). 따라서 *Penicillium* 균의 경우는 향후 종 수준에서의 연구가 좀 더 필요하다.

나무칩에서는 *Hypocrea virens*, *H. lixii*, *H. lutea*, *Penicillium carneum*, *Penicillium* sp., *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma* sp., *T. viride* 등 3속 8종이 동정되었고, 벌레에서는 *Hypocrea koningii*, *H. virens*, *H. lixii*, *H. lutea*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma* sp., *T. viride* 등 2속 7종이 동정되었다. 이중에 *H. virens*, *H. lixii*, *H. lutea*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma* sp., *T. viride*는 공통으로 분리된 종들이었다. 분리된 진균 종을 보면 목재를 부후 시키는 균으로 알려진 불완전균류인 *Trichoderma* 균들이 대부분인 것을 알 수 있었다. 그러나 병원균인 *Raffaelea quercus-mongolicae*는 존재하지 않는 것을 알 수 있었다. 이것으로 볼 때 훈증처리 방제된 참나무감염목에는 더 이상 참나무시들음병균이 존재하지 않음을 확인 할 수 있었다.

조사된 진균 종들은 토양이나 식물체, 펄프, 자른 나무의 표면 등 섬유질이 풍부한 것에서 쉽게 분리되는 것으

로 알려진 진균이었다. *T. viride*를 포함하여 *Trichoderma* 속에 속하는 여러 종들은 cellulase 를 분비하여 목재의 섬유소를 분해하고 목재 표층부를 손상시키고 더 나아가 표면을 잘 부서지게 하거나 표면을 염색 또는 변색시키는 것으로 알려져 있다(Mandels and Reese, 1957). 본 연구에서 수집한 참나무시들음병 방제목에서 관찰된 목재 푸석하면서 만지면 부서지는 목재 부후 특성(Fig. 2B-D)은 바로 동정된 이들 *Trichoderma* 균들에 의해 야기된 것으로 사료된다.

한편 조사된 *Trichoderma* 균류 중 일부는 최근에 국내 표고재배 시설의 골목에서도 보고되었다. *Hypocea lutea*의 불완전 세대인 *Gliocladium viride*와 *T. citrinoviride*가 버섯 파리에 의해 피해를 입은 표고버섯을 재배하는 참나무 골목에서도 발견되었다(Kim *et al.*, 2010; 2012). *G. viride*는 일본에서도 버섯재배 시설에서 분리된 바 있다(Ganbank accession no. AB298706).

T. citrinoviride 또한 cellulose 분해 효소를 분비하는 능력이 있음과 표고골목에 접종 시 골목을 가해하는 특성이 있는 것으로 보고 되었다(Kim *et al.*, 2012). 이러한 배경을 볼 때 표고재배사에 버섯파리류 피해와 연계되었던 *Trichoderma* 종들의 기원이 사실은 참나무가 자라던 산림에 존재하는 균이라는 것을 인지 할 수 있다. 이러한 사실과 본 연구조사 결과를 비추어 볼 때 참나무를 이용하여 표고를 재배하고자 할 때는 표고재배에 위해가 될 수 있는 *Trichoderma* 종들이 표고 재배사에 들어가기 전에 그 밀도를 낮추거나 제거하는등 적절한 위생처리 조치가 필요할 것으로 사료된다.

결론으로서 훈증방제 처리된 참나무시들음병 감염목은 3년 이상 지나면 참나무시들음병 병원균이나 매개충이 존재하지 않고 자연스럽게 부후되는 상태에 있음을 본 연구 결과는 보여주었다. 이에 따라 방제 처리된 참나무로부터 시들음병원균의 재감염 가능성은 없는 것으로 판단된다. 앞으로는 좀 더 정확히 어느 시점에서 현재 국내 전국적으로 여러 공원 및 산에 산재해 있는 훈증처리목의 경우 비닐을 제거하고 혐오스러운 표식과 경고 사인 등을 제거하여도 무방할지 에 대한 판단을 줄 연구가 필요하다.

적 요

한국에서 발병하는 참나무시들음병은 암브로시아 곤충인 *Platypus koryoensis*에 의해 전파되는 *Raffaelea quercus-mongolicae* 균류에 의해 발생한다. 이 병의 전파를 방지하기 위해 참나무시들음병 감염목을 벌채 후 비닐막을 씌워 훈증하고 벌채장소에 3년 이상 방치시키고 있다. 본 연구는 이런 훈증처리된 감염목에 존재하는 균류에 대한 정보를 얻고자 수행하였다. 천안 태조산 지역 두 곳에서 훈증처리된 감염목을 채집하고 진균을 분리하여 99개 균주를 얻었다. 분리 균주를 형태적 특성과 translation

elongation factor 1-alpha 유전자와 ITS rDNA region 염기서열에 의거한 분자적 방법으로 동정한 결과 *Hypocea*, *Trichoderma*, *Penicillium* 속에 속하는 종들이 확인되었다. 이중 *Trichoderma* 속에 속하는 종이 주요 균류이었다. 조사결과 병원균인 *R. quercus-mongolicae*와 매개충인 *P. koryoensis*는 검출되지 않았다. 본 연구결과는 훈증 처리한 참나무시들음병 감염목이 3년 이상 되면 더 이상의 피해를 유발할 위험요소가 없다는 과학적 증거를 제시한다.

감사의 글

본 연구는 산림청 ‘산림과학기술개발사업(과제번호: S111212L090100)’과 국립산림과학원의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

참고문헌

- Evidente, A., Ricciardiello, G., Andolfi, A., Sabatini, M. A., Ganass, I. S., Altomare, C., Favilla, M. and Melck, D. 2008. Citranthidiene and citranthidiol: bioactive metabolites produced by *Trichoderma citrinoviride* with potential antifeedant activity toward aphids. *J. Agric. Food Chem.* 56:3569-3573.
- Kim, J. Y., Yun, Y. H., Hyun, M. W., Kim, M. H. and Kim, S. H. 2010. Identification and characterization of *Gliocladium viride* isolated from mushroom fly infested oak log used for shiitake cultivation. *Mycobiology* 38:7-12.
- Kim, J. Y., Kwon, H. W., Tang, L. and Kim, S. H. 2012. Identification and characterization of *Trichoderma citrinoviride* isolated from mushroom fly-infested oak log beds used for shiitake cultivation. *Plant Pathol. J.* 28:219.
- Kim, K. H., Choi, Y. J., Seo, S. T. and Shin, H. D. 2009. *Raffaelea quercus-mongolicae* sp. nov. associated with *Platypus koryoensis* on oak in Korea. *Mycotaxon* 110:189-197.
- Mandels, M. and Reese, E. T. 1957. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J. Bacteriol.* 73:269-278.
- Overton, B. E., Stewart, E. L. and Geiser, D. M. 2006. Taxonomy and phylogenetic relationships of nine species of *Hypocea* with anamorphs assignable to *Trichoderma* section *Hypocreanum*. *Stud. Mycol.* 56:39-65.
- Richard, A. H., Nichole, B. and Stephen, J. V. 2002. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *J. Microbiol. Methods* 50:319-323.
- Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B.-S., Petrini, O., Schroers, H.-J. and Druzhinina, I. S. 2006. The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Stud. Mycol.* 56: 67-133.
- Suh, D. Y., Hyun, M. W., Kim, S. H., Seo, S. T. and Kim, K. H. 2011. Filamentous fungi isolated from *Platypus koryoensis*, the insect vector of oak wilt disease in Korea. *Mycobiology* 39:314-316.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, pp. 315-322. Academic Press, Sandiego.