

인삼 뿌리썩음병균 *Cylindrocarpon destructans*의 후막포자 발아에 미치는 배양온도 및 pH의 효과

조대휘# · 유연현

한국인삼연초연구원
(2001년 7월 12일 접수)

Effect of Incubation Temperature and pH on Chlamydospores Germination of *Cylindrocarpon destructans* Causing Root Rot of *Panax ginseng*

Dae-Hui Cho# and Yun-Hyun Yu

Korea ginseng & Tobacco Research Institute, Suwon 441-480, Korea

(Received July 12, 2001)

Abstract : Effects of incubation temperature and pH on chlamydospore germination of *Cylindrocarpon destructans* (isolate CY-9802) causing root rot of *Panax ginseng* were studied. Germination rate of the chlamydospores on Czapek solution agar (CSA) was higher than on potato dextrose agar (PDA) at the incubation temperatures tested. The chlamydospores were able to be germinated at range of 5°C to 30°C after 48 hours incubation on CSA. Germination rate was 53.2~62.7% at range of 15°C to 25°C, and the optimum temperature was 20°C, whereas they were very low at 30°C as showing 6.9%. Meanwhile, they were able to be germinated at range of 5°C to 25°C but not at 30°C on PDA. Germination rate was 43.6% to 47.9% at range of 10°C to 20°C, and the optimum temperature was 20°C as well. They were able to be germinated at pH of 5.2 to 8.1 on CSA and 5.2 to 7.2 on PDA. Optimum pHs for the germination on CSA and PDA were from 6.4 to 8.2 and from 5.2 to 6.0, respectively. Mycelial color of the fungus on CSA was pale brown at pH from 5.2 to 6.0 and white from pH 6.4 to 8.1, while it was typical dark brown at range of pH 5.2 to 7.1 and brown at pH 7.2 on PDA after 21 days incubation.

Key words : *Cylindrocarpon destructans*, chlamydospore germination, root rot, incubation temperature, pH, *Panax ginseng*

서 론

인삼 연작장해의 원인균인 뿌리썩음병균 *Cylindrocarpon destructans*^{1,2,3)}는 토양에서 월동이 가능한 후막포자를 형성하여 오랜 기간동안 토양에 존재하면서 인삼의 뿌리를 침입하게 된다.^{4,5)} 따라서 인삼의 연작장해를 해소하기 위해서는 *C. destructans* 후막포자에 대한 생리, 생태적 특성을 구명하여 효율적인 병방제 방법을 개발하여야 한다. 특히 *C. destructans* 후막포자의 발아특성 연구는 앞으로 이 병원균의 토양내 밀도를 측정할 수 있는 선택배지 또는 생물검정(bioassay) 방법의 개발을 위해 필수적이다. 이와 같은 연구를 위해서 최근에 배양조건별로 *C. destructans* 후막포자의 생성 특성에 관한

연구가 1단계로 수행이 되었고,^{4,5,6,7)} 이후 지금까지 2단계로 후막포자의 분리 방법에 관한 연구가 보고되고 있다.⁸⁾

대형 분생포자로부터 변형된 후막포자가 관찰된 것은 *Fusarium* sp^{9,10)}와 미국삼 뿌리썩음병 조직에서 분리한 *C. destructans*⁶⁾에서 보고되었다. 따라서 *C. destructans*의 후막포자 분리 방법에 관한 연구는 대형 분생포자로부터 후막포자의 생성을 유도하는 것으로부터 시작되었으나 한국산 인삼의 뿌리썩음조직에서 분리된 *C. destructans*에서는 대형 분생포자로부터 변형된 후막포자가 관찰되지 않았다.⁶⁾ 그러므로 *C. destructans* 균사체로부터 변형된 후막포자를 대상으로 균사체를 제거하여 후막포자만을 분리하는 방법의 개발로 연구 방향이 바뀌게 되었다. 즉 *C. destructans*를 배지에 배양한 후, 기중(氣中) 균사를 제거하고 광조건에서 균사체 변형 후막포자의 생성을 촉진하는 방법에 관한 연구가 보고⁷⁾되었고, 이 균사체를 미세하여 초음파를 처리함으로써 후막포자를 효과적으로 분리하는 방법이 개발되었다.⁸⁾ 본 연구는 이러한 방법

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 031-419-4131; (팩스) 031-419-9434
(E-mail) daehui99@gr.kgtri.re.kr

을 이용하여 분리된 *C. destructans* 후막포자를 공시하여 환경조건에 따른 후막포자의 발아특성을 구명하기 위해 우선 배양온도 및 배지의 pH가 후막포자의 발아에 미치는 영향에 대해서 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시균주

1998년 6월 한국인삼연구소 연구원 수원시험장 2년생 인삼의 뿌리썩음병 증상에서 분리한 *Cylindrocarpon destructans*(균주 번호 CY-9802)를 공시균주로 사용하였다.

2. *C. destructans* 균사체로부터 공시 후막포자 분리

*C. destructans*의 배양 및 후막포자 생성방법은 공시균주를 potato dextrose agar(PDA, Difco)에 접종, 20°C에서 9일간 암배양하여 배지전체에 균사체를 생육시킨 뒤, 조 등⁷⁾의 방법과 같이 기중 균사체를 유리봉으로 제거하고 20°C에서 55일간 광·암 교차배양(12 hrs/12 hrs)하여 후막포자의 생성을 유도하면서 광에 의해 균사체의 분해가 이루어 지도록 하였다(광 조사량 : 180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$). 생육배지에서 *C. destructans*의 후막포자 분리는 조 등⁸⁾의 방법과 같이 생육된 배지 절편 약 4 cm²를 취하여 멸균된 30 ml의 tissue grinder (Wheaton No. 358049, U.S.A) 용기에 넣고 멸균수 20 ml를 가하였다. 이를 Homogenizer[Wheaton No. 903475, Over-head stirrer, U.S.A, speed range: 1,000~10,000 rpm(no load)] scale 4에서 10초간 마쇄하였다. 그리고 마쇄액 10 ml를 50 ml 용량의 멸균된 원심분리용 cap test tube에 넣고 얼음으로 냉각하면서 ultrasonic processor(Cole-Parmer 4710 series, U.S.A, 20kcycles/second)를 사용하여 [amplitude: 100 scale, pulser: 6초(duration: 1초), 방출 최대 18 watts/cm²] 후막포자를 분리하였다.

3. 배양온도별 *C. destructans* 후막포자의 발아율 조사

*C. destructans*의 후막포자 발아에 미치는 온도 영향을 조사하기 위해 배지는 감자 추출물배지인 PDA와 화학합성배지인 Czapek Solution Agar(CSA, Difco)의 두가지로 구분하여 공시하였다. PDA 배지는 연구중에 있는 *C. destructans* 선택배지 개발연구의 기본배지로 사용¹³⁾ 되고 있기 때문에 공시하였으며 화학합성배지인 CSA 배지는 다음 4변항의 발아에 미치는 pH 효과시험과 연계하기 위해 사용하였다. 후막포자의 발아시험을 위한 배양온도는 5~30°C 범위에서 5°C 간격으로 구분하여 조사하였으며, 배지의 세균 오염을 억제하기 위해서 멸균된 배지를 40~45°C로 냉각하고 streptomycin sulfate 100 ppm과 rose bengal 50 ppm¹¹⁾을 첨가한 후

사용하였다. 후막포자의 발아율 조사방법은 초음파 처리를 한 균사 마쇄액(후막포자 농도 : 10⁴ chlamydo spores/ml)의 0.1 ml를 취해 각 petri dish(직경 9 cm)의 배지상면에 도말하여 각 petri dish당 10³개의 후막포자를 접종하였다. 이때 접종한 후막포자가 배지에 고루 분포되고 그 액이 충분히 흡수되도록 평판배지를 만든 후 하룻밤 건조시킨 상태에서 사용하였다. 후막포자의 발아율은 각 배양온도의 항온기에서 2일간 배양한 후 광학현미경 하에서 후막포자 100개당 발아개수를 3반복으로 측정하였다.

4. 배지 pH별 *C. destructans* 후막포자의 발아율 및 균총색상 변화조사

*C. destructans*의 후막포자 발아에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해 배지는 CSA와 PDA의 두 가지로 구분하여 공시하였다. 화학합성배지인 CSA 배지는 발아에 미치는 pH의 순수한 효과를 얻기위해 사용하였고 감자 추출물배지인 PDA 배지는 연구중에 있는 *C. destructans* 선택배지 개발연구의 기본배지로 사용¹³⁾되고 있기 때문에 공시하였다. 배지의 pH를 조절하기 위해서 citrate-phosphate(McIlvane) buffer를 이용하여 pH를 5.0, 5.4, 6.0, 6.4, 7.0, 7.4, 8.0으로 만들고, PDA와 CSA 각 배지 조제에 첨가하였다. 이때 배지의 실제 pH 측정은 buffer의 각 pH 용액으로 조제한 agar를 제외한 동일성분의 액체배지를 멸균(121°C, 15분) 한 후 냉각하여 측정하였다. 이때 배지의 세균 오염을 억제하기 위해서 멸균된 각 pH의 배지를 40~45°C로 냉각하고 streptomycin sulfate 100 ppm과 rose bengal 50 ppm을 첨가¹¹⁾한 후 사용하였다. 공시된 *C. destructans* 후막포자는 PDA와 CSA의 각 pH별 배지(직경 9 cm petri dish 평판배지)당 10³개의 후막포자를 접종하였다. pH별 후막포자의 발아율 조사는 15°C에서 2일간 배양한 후 광학현미경 하에서 후막포자 100개당 발아개수를 3반복으로 측정하였고, 이후 배양 8, 12, 15일후 균총의 색상변화도 함께 조사하였다.

결과 및 고찰

조 등의 방법⁸⁾에 의해 *C. destructans*의 균사체 배지절편에서 분리된 후막포자를 공시하여 접종한 각 배지에서 배양온도별로 후막포자 발아율을 측정된 결과는 Fig. 1, 2와 같다. CSA 배지에서는 5~30°C 범위에서 발아가 가능하였는데, 발아 적정온도 범위는 후막포자 발아율이 53.2~62.7% 인 15~25°C 이고 발아 최적온도는 20°C로서 발아율은 62.7% 이었다. 5°C에서는 9.8%의 낮은 발아율을 보였는데 이것은 배양 2일 후 측정된 것으로 조 등의 보고⁷⁾와 같이 장기간 배양할 경우 발아율 증가가 예상된다. 30°C에서는 6.9%

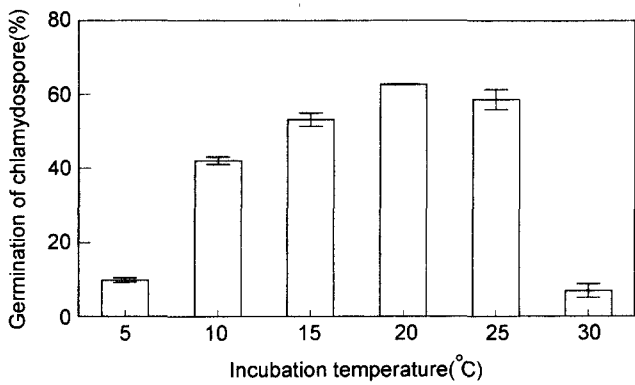


Fig. 1. Effect of incubation temperature on chlamydospore germination of *Cylindrocarpon destructans* on Czapek solution agar. Chlamydospores of the fungus (isolate CY-9802) were prepared from the methods of production and isolation by Cho *et al.*^{7,8)} The datum is average of three replicates and vertical bar indicates a standard error.

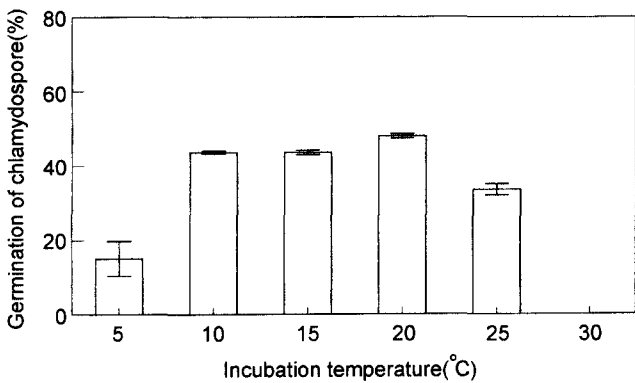


Fig. 2. Effect of incubation temperature on chlamydospore germination of *Cylindrocarpon destructans* on potato dextrose agar. Chlamydospores of the fungus (isolate CY-9802) were prepared from the methods of production and isolation by Cho *et al.*^{7,8)} The datum is an average of three replicates and vertical bars indicates a standard error.

의 발아율로서 매우 저조하였고 발아된 균사의 신장도 매우 미약하였다. PDA 배지에서는 5~25°C 범위에서 발아가 가능하였고 전체 온도범위에서 각 발아율은 CSA배지의 경우에 비해 낮았다. 발아 적정온도 범위는 10~20°C로서 43.6~47.9%의 발아율을 보였고, 발아 최적온도는 20°C로서 47.9%가 발아하였다. 그리고 25°C에서는 발아율이 33.5%로, 10~20°C의 발아율보다 낮았다. 5°C에서는 15.0%의 낮은 발아율을 보였고 30°C에서는 전혀 발아되지 않았다. 이와 같이 *C. destructans* 후막포자의 최적발아 온도는 CSA와 PDA배지에서 동일하게 20°C로 측정되었다.

CSA 배지에서는 Fig. 3과 같이 pH 조사범위 5.2~8.1 사이의 전체에서 후막포자가 발아 가능하였으며 조사된 pH 범위 전체에서 발아율은 최저 29.9%에서 최고 45.7%로 측정

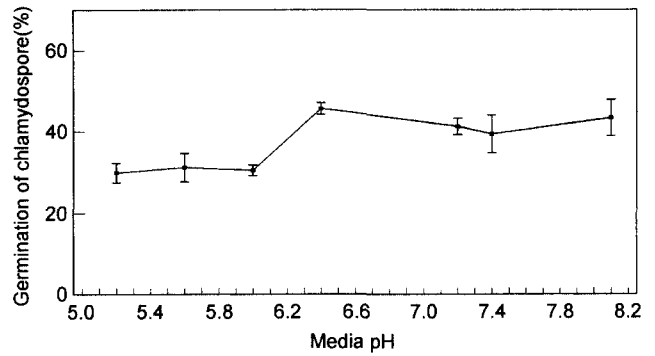


Fig. 3. Effect of pH on chlamydospore germination of *Cylindrocarpon destructans* on Czapek solution agar. pH of the medium was adjusted by citrate phosphate (McIlvane) buffer. Chlamydospores of the fungus (isolate CY-9802) were prepared from the methods of production and isolation by Cho *et al.*^{7,8)} The datum is an average of three replicates and vertical bar indicates a standard error.

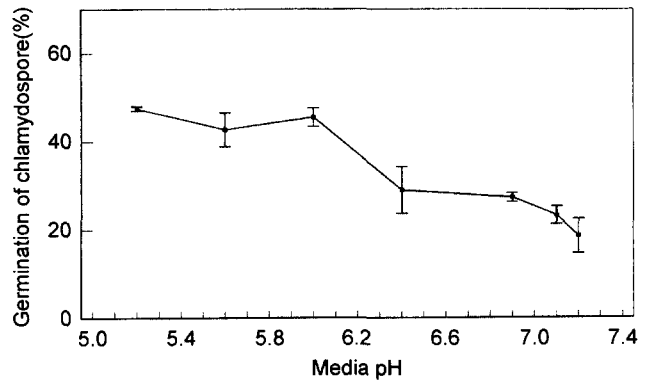


Fig. 4. Effect of pH on chlamydospore germination of *Cylindrocarpon destructans* on potato dextrose agar. pH of the medium was adjusted by citrate phosphate (McIlvane) buffer. Chlamydospores of the fungus (isolate CY-9802) were prepared from the methods of production and isolation by Cho *et al.*^{7,8)} The datum is an average of three replicates and vertical bar indicates a standard error.

되었다. 이중에서 발아적정 pH는 6.4~8.0의 약산성~알칼리성 범위로서, 발아율은 39.5~45.7%로 조사되었고 이 pH 범위에서 처리간에 통계적 유의성은 없었다. PDA에서 배지 pH별 후막포자 발아특성을 조사한 결과(Fig. 4), CSA 배지의 경우에는 다르게 pH 6.4~7.2의 약산성~중성 범위에서 발아율은 18.6~29.0%로 낮았으며 후막포자 발아적정 pH는 5.2~6.0로서 이때 후막포자 발아율은 42.7~47.5% 이었다. 이와 같이 CSA 배지와 PDA 배지간에 pH별 후막포자 발아특성이 다르게 나타났는데 그 이유는 화학 합성배지인 CSA와 감자추출물 배지인 PDA 배지간의 특성일 것으로 판단되나 앞으로 더욱 연구가 필요하다. 그리고 최초 배지를 각각의 pH로 조절하는 과정에서 차이가 있었는데, 즉 citrate-phosphate(McIlvane) buffer 용액으로 pH를 조절할 때 CSA

배지는 pH 5.0~8.1 까지 용이하게 조절이 되었으나 PDA배지에서는 알칼리성으로 조절하기가 어려워 pH 5.0~7.2 의 적은 범위로 조절이 되었다. 따라서 넓은 범위의 산성~알칼리성 조건에서 후막포자의 발아율 조사를 위해서는 PDA배지보다 CSA 배지가 적당할 것으로 판단된다.

Czapek Dox broth를 이용하여 *C. destructans* 후막포자 발아에 미치는 배양온도, pH 등에 대해 조사한 유 등¹²⁾의 보고에 의하면 본 시험과 다르게 배양온도 20°C 이상, 그리고 pH 7.0 에서는 발아율이 저조한 것으로 나타났다. 이와 같은 결과와 고체배지를 사용한 본 시험 결과와의 차이점으로 미루어 앞으로 *C. destructans* 후막포자 발아에 미치는 고체와 액체배양간의 특성 구명에 대한 연구가 필요하다고 판단된다.

배지 pH별로 후막포자 발아에 의한 균총형성 특성을 조사한 결과 CSA 배지에서는 배양 후 15일이 되어도 균총의 색상은 백색으로 변화가 없었다. 그러나 배양 21일 경과 후에

는 산성범위인 pH 5.2~6.0 범위에서만 연갈색 균총으로 변화하였다(Table 1).

PDA에서는 CSA배지의 경우와는 다르게 배양 12일 후에 산성인 pH 5.2, 5.6 에서 암갈색 균총이 백색균총과 같이 형성되었고, 나머지 pH 6.0 이상에서는 CSA 배지의 경우와 같이 전체가 백색의 균총을 형성하였다. 배양 15일 후에는 배지 pH 5.2~7.2 전체에서 부분적으로 갈색~암갈색 균총이 형성되었고, 배양 21일 후에는 pH 5.0~7.1에서 암갈색화된 균총이 형성되었다(Table 2). *C. destructans*의 전형적인 균총 색상은 암갈색으로서, PDA에서 이러한 암갈색 균총형성이 CSA배지와 달리 넓은 pH에서 형성되는 것이 확인되었다. 또한 일반적으로 통용되는 PDA 제품(Difco社)을 사용하여 *C. destructans*를 배양 할 경우 항상 암갈색의 균총이 형성되는데 그 이유는 pH가 5.6±0.2의 범위로 조제되는 PDA 배지의 제품의 특성¹⁴⁾으로 판단된다.

요 약

배양온도 및 배지의 pH가 인삼 뿌리썩음병균 *Cylindrocarpon destructans* 후막포자의 발아에 미치는 영향을 배지별로 조사한 결과는 다음과 같다.

배양온도별 후막포자 발아율은 Czapek solution agar(CSA) 배지가 potato dextrose agar(PDA)보다 높았다. CSA 배지의 경우에는 배양온도 5~30°C에서 후막포자의 발아가 가능하였으며 15~25°C 에서 발아율은 53.2~62.7%로서 발아적정 온도범위로 측정되었다. 후막포자 발아 최적 배양온도는 20°C로 발아율은 62.7% 이었고, 30°C에서는 6.9%의 매우 저조한 발아율을 보였다. PDA 배지에서는 5~25°C에서 후막포자가 발아 가능하였고 30°C에서는 발아가 관찰되지 않았다. 10~20°C 에서 발아율이 43.6~47.9%로서 발아적정 온도범위로 측정되었다. 후막포자 발아최적 배양온도는 20°C로 발아율은 47.9% 이었다.

Table 1. Effect of pH on the change of colony color of *Cylindrocarpon destructans* on Czapek solution agar (CSA)

| pH ^{a)} | Incubation days after inoculation of chlamyospores ^{b)} on CSA | | | |
|------------------|---|-------|-------|--------------------|
| | 8 | 12 | 15 | 21 |
| 5.2 | White ^{c)} | White | White | Pale brown |
| 5.6 | White | White | White | Pale brown |
| 6.0 | White | White | White | Pale brown |
| 6.4 | White | White | White | White |
| 7.2 | White | White | White | White & Pale brown |
| 7.4 | White | White | White | White |
| 8.1 | White | White | White | White |

^{a)}pH of medium was adjusted with citrate-phosphate (McIlvane) buffer.

^{b)}Chlamyospores of the fungus (isolate CY-9802) were prepared from the methods of production and isolation by Cho *et al.*^{7,8)}

^{c)}Colony colors of *C. destructans* were observed from the cultures grown at 15°C.

Table 2. Effect of pH on the change of colony color of *Cylindrocarpon destructans* on potato dextrose agar (PDA)

| pH ^{a)} | Incubation days after inoculation of chlamyospores ^{b)} on PDA | | | |
|------------------|---|--------------------|--------------------|------------|
| | 8 | 12 | 15 | 21 |
| 5.2 | White ^{c)} | White & Dark brown | Dark brown | Dark brown |
| 5.6 | White | White & Dark brown | White & Dark brown | Dark brown |
| 6.0 | White | White | Pale brown & brown | Dark brown |
| 6.4 | White | White | Pale brown & brown | Dark brown |
| 6.9 | White | White | Pale brown & brown | Dark brown |
| 7.1 | White | White | Pale brown & brown | Dark brown |
| 7.2 | White | White | Pale brown & brown | Brown |

^{a)}pH of medium was adjusted with citrate-phosphate (McIlvane) buffer.

^{b)}Chlamyospores of the fungus (isolate CY-9802) were prepared from the methods of production and isolation by Cho *et al.*^{7,8)}

^{c)}Colony colors of *C. destructans* were observed from the cultures grown at 15°C.

C. destructans 후막포자는 CSA 배지의 pH 5.2~8.1 조사 범위 전체에서 발아되었으며 발아적정 pH 범위는 pH 6.4~8.1 이었다. PDA 배지의 경우는 pH 5.2~7.4의 조사 범위 전체에서 발아가 확인되었으며 발아적정 pH 범위는 pH 5.2~6.0 이었다.

C. destructans 후막포자를 21일간 배양한 후 생성된 균총의 색상을 배지 pH별로 조사한 결과, CSA 배지의 경우 pH 5.2~6.0 범위에서 연한 갈색, pH 6.4~8.1 에서 백색의 균총을 형성한 반면, PDA 배지에서는 pH 5.2~7.1에서 *C. destructans*의 전형적인 암갈색 균총을 형성하였고 pH 7.2에서는 갈색균총을 형성하였다.

감사의 말씀

본 연구는 1999년도부터 2000년도까지 한국인삼공사 출연금으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Chung, H. S. : *Rept. Tottori Mycol. Inst.(Japan)* **12**, 127 (1975).
2. 오승환, 유연현, 김기황, 조대휘: 인삼연구보고서(재배분야), 한국인삼연초연구원, p. 150 (1992).
3. 조대휘, 박규진, 유연현, 오승환, 이호자 : *고려인삼학회지* **19**, 177 (1995).
4. 조대휘, 유연현, 오승환, 이호자 : *고려인삼학회지* **20**, 94 (1996).
5. 조대휘, 유연현, 오승환, 이호자 : *한국식물병리학회지* **13**, 34 (1997).
6. 조대휘, 유연현, 오승환, Jennifer L. Park : *고려인삼학회지* **22**, 307 (1998).
7. 조대휘, 유연현, 오승환 : *고려인삼학회지* **23**, 129 (1999).
8. 조대휘, 유연현 : *고려인삼학회지* **24**, 53 (2000).
9. French E. R. and Nielson, L. W. : *Phytopathology* **56**, 1322 (1966).
10. Short G. E. and Lacy, M. L. : *Phytopathology* **64**, 558 (1974).
11. Dhingra, O. D. and Sinclair, J. B. : *Basic plant pathology method*, 2nd ed., CRC Press Inc., Florida, p. 227 (1995).
12. 유성준, 조진웅, 조재성, 유승현 : *한국식물병리학회지* **12**, 422 (1996).
13. 유연현, 백종운, 김기황, 조대휘 : 인삼연구보고서(재배분야), 한국인삼연초연구원, p.127 (1999).
14. Difco manual, 10th edition, Difco laboratories, Detroit, Michigan U.S.A p. 690 (1985).