

## 배양기간, 온도, pH가 인삼 근부병균 *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten의 균사생육에 미치는 영향\*

조대휘 · 안일평<sup>1</sup> · 유연현 · 오승환 · 이호자<sup>2</sup>

한국인삼연구소연구원, <sup>1</sup>서울대학교 농생물학과, <sup>2</sup>경희대학교 생물학과  
(1995년 7월 11일 접수)

### Effect of Incubation Period, Temperature and pH on Mycelial Growth of *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten Causing Root-rot of Ginseng

Dae-Hui Cho, Il-Pyung Ahn<sup>1</sup>, Yun-Hyun Yu, Seung Hwan Ohh and Ho-Sa Lee<sup>2</sup>

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Suwon 440-600, P. O. Box 59, Korea

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

<sup>2</sup>Department of Biology, Kyung-Hee University, Seoul 130-701, Korea

(Received July 11, 1995)

**Abstract** *Cylindrocarpon destructans* isolate CY-92-01, pathogen of root-rot of *Panax ginseng*, showed the maximum mycelial growth on the Czapek solution agar among the thirteen kinds of media. Five isolates (Isolate CY-92-01, CY-92-03, CY-92-07, CY-94-01, CY-94-02) of *C. destructans* from various growth stages of *P. ginseng* recovered from several geographical sites also showed maximum growth in the Czapek-Dox broth compared with potato dextrose broth and V-8 juice broth.

Rapid growth rate was maintained until 12 days after inoculation on the Czapek-Dox broth and mycelial weight was somewhat constant until 20 days. After 30 days of incubation, the mycelial weight began to decrease. The fungal growth occurred from 5°C to 25°C and optimum temperature for growth was 20°C. Mycelial weight orderly decreased at 15, 25, 10, and 5°C. Quantitative measurement was impossible at 5°C. No fungal growth was occurred at the temperature higher than 30°C. Growth was observed at all tested pH ranges from 2.8 to 8.0. Optimum pH for growth was 4.0~5.0 followed by pH 3.3~3.5 and 5.4~6.0. The least growth occurred at pH 2.8.

**Key words** *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten, root-rot, *Panax ginseng*, mycelial growth.

#### 서 론

인삼의 근부병균(根腐病菌: root-rot, 뿌리썩음병균) *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten은 연작장해의 원인균으로 밝혀져 있다.<sup>1, 3)</sup> 이 병원균의 생리적 특성에 관한 연구는 매우 적어 1964년 Scholten<sup>4)</sup>에 의하여 *C. destructans*로 최종 결정되기 전에 *C. radicola*로서 명명되었던 시기인 1961년 Atkinson<sup>5)</sup>

이 배양중에 아미노산류의 이용도와 분비에 관한 보고를 시작으로 1964년 Taylor<sup>6)</sup>에 의해 콩의 根面에서 같이 분리되는 *Fusarium oxysporum*과 온도, pH 등에 의한 생육특성 비교가 보고되었다. 1966년에 Evans와 White<sup>7)</sup>는 *C. destructans*에서 생성되는 진균성 독소에 관한 연구로서 배지의 탄소, 질소원별 균사 생육량과 독소 생성량의 차이를 보고하였다. 그리고 일본에서 1970년 Miyazawa<sup>8)</sup>가 생육에 미치는 온도의 영향을 보고한 것 등 몇개의 보고가 있을 뿐이다.

국내에서는 1975년 Chung<sup>9)</sup>이 *C. destructans*에 의

\*본 연구는 1995년도 한국담배인삼공사 출연금에 의해 수행되었음.

한 인삼 근부병 발병 특성에 관한 최초 보고에서 배양온도, 光, 배지의 pH, 배지종류 등 다양한 요인에 의한 생육차이를 보고한 바 있다. 그 후 생육특성에 관련된 보고는 최근인 1992년이 되어서야 인삼의 연작장애에 관련된 근부병균으로 *C. destructans*가 재분리되어 확인이 되자,<sup>2)</sup> 이 병원균에 대한 관심이 깊어지게 되었음은 물론이고 나아가서는 인삼의 연작장애를 해결하고자 하는 연구의 일환으로 유 등<sup>10,11)</sup>에 의해서 이 병원균의 선택배지 개발을 위해 온도, pH 등 배양 조건과 항균물질 첨가에 따른 생육특성 등이 보고된 바 있다.

이 병원균에 대하여 국내의 연구보고가 아직 미진하고 국외적으로도 생리적 특성에 관한 연구가 다른 병원균에 비해서 많지 않은데, 그 이유는 이 병원균의 기주식물이 인삼이외에 경제적 가치가 높거나 관심이 높은 식량관련 작물이 아니고 수목류나 화훼류에 국한되었기 때문으로 생각된다.

연작장애 해소를 위한 인삼 근부병의 예방이나 방제방법을 제시하기 위해서는 기본적으로 이 병원균의 생리적 특성에 관한 상세한 연구가 필요하다. 본 연구는 재배 지역별로 인삼의 근부조직에서 분리된 *C. destructans* 균주들을 공시, 군사생육이 양호한 배지를 선정하여 배양기간, 온도, pH 등에 의한 각 균주들의 균체 생육량을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 배지별 군사생육

*C. destructans*의 생육특성 조사에 적당한 배지를 선정하기 위해 Czapek solution agar(Difco), Potato dextrose agar(Difco), V-8 juice agar, Oat meal agar, Corn meal agar(Difco), Malt extract agar(Difco), Saboraud agar, Yeast extract agar(yeast extract:Difco), Tryptic soy agar(Difco), Lima bean agar(Difco), Tomato juice agar(Difco), Gallic acid agar 등 13종을 사용하였다. 공시균주로는 인삼에 대한 병원성이 확인되어 한국인삼연구원 병해충연구실에 보관중인 CY-92-01(Table 1)을 공시하였다. 접종원은 CY-92-01 균주를 Potato dextrose agar(Difco) 사면배지에서 2주간, 20°C에서 암배양하여 멸균수를 넣고 흔든 뒤 cheese cloth 3겹으로 여과하여 수확한 분생포자를 사용하였다. 접종은 각 배지위에  $5 \times 10^2$  conidia/plate

**Table 1.** List of isolates of *Cylindrocarpon destructans* tested

Isolate <sup>a</sup>	Origin	Year
CY-92-01	Seosan, 2year-old, root	1992
CY-92-03	Suwon, 3year-old, root	1992
CY-92-07	Pocheon, 2year-old, root	1992
CY-94-01	Suweon, 6year-old, root	1994
CY-94-02	Jeungpyung, 2year-old, root	1994

<sup>a</sup>The isolates were obtained from single spore and maintained on Potato dextrose agar at 4°C.

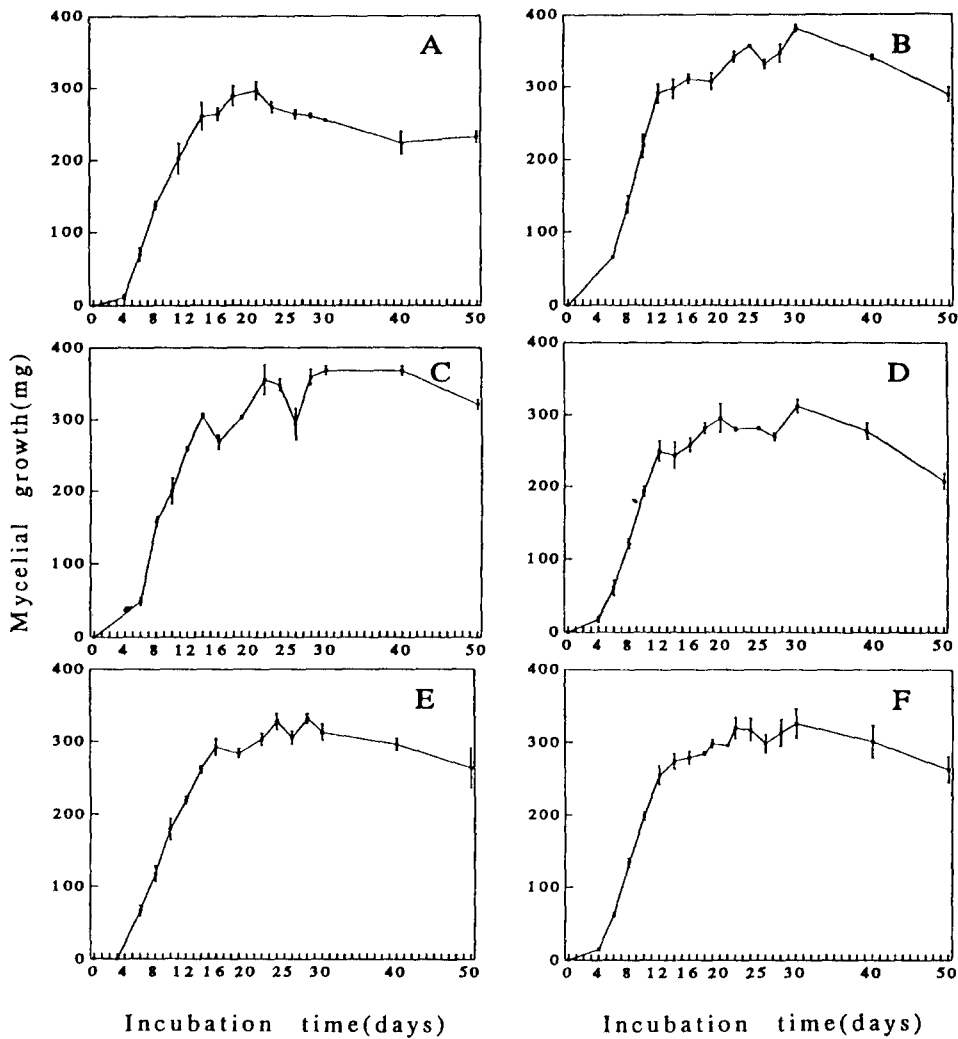
media 수준으로 분생포자를 도달하여 25°C에서 16일간 배양하고 각 균총의 생육정도 및 색상을 조사하였다.

Table 1과 같이 공시균주 5개를 대상으로 Czapek-Dox broth(Difco), Potato dextrose broth(Difco), V-8 juice broth(V-8 juice: 미국, Campbell社)의 액체배지를 선정하여 Taylor<sup>6)</sup>의 방법에 따라 citrate-phosphate(McIlvaine) buffer pH 4.0 용액으로 각 배지를 조제하였다. 그리고 100 ml erlenmyer flask에 20ml의 각 공시 배양액을 분주하여 멸균한 후 Potato dextrose agar 사면배지로부터 수확된 분생포자를 각각  $10^3$  conidia/20 ml media 수준으로 접종하였다.

군사 생육량 조사를 위한 배양기간은 Fig. 1의 F와 같이 20°C 항온기에서 생육의 휴지기(stationary phase)에 도달하는 20일간으로 설정하였다. 배양 후 filter paper(Toyo No. 2)로 여과하여 거른 군사를 England와 Roth<sup>12)</sup>의 방법으로 75°C에서 恒量에 도달할 때까지인 약 8시간 건조 후 乾重量을 측정하였다.

### 2. 배양기간, 온도 및 pH별 군사생육

Taylor<sup>6)</sup>의 방법과 같이 citrate-phosphate(McIlvaine) buffer pH 4.0 용액으로 조제한 Czapek-Dox solution(Difco)을 공시하여 상기와 같은 방법으로 접종하고 배양기간, 배양온도, 배지 pH별 군사 생육량을 조사하였다. 배양기간별 군사생육은 20°C, 50일간 배양하면서 경시적으로 역시 상기와 같은 방법으로 건중량을 측정하였다. 배양온도별 생육량은 5~40°C 범위중 5°C 간격의 각 항온기에 배양하여 조사하였다. 배지 pH별 생육은 citrate-phosphate buffer pH 2.6, 3.0, 3.2, 3.4, 4.0, 4.4, 5.0, 5.4, 6.0, 6.4, 7.0, 7.6, 8.0으로 구분하여 조제한 각 pH의 Czapek-Dox broth(Difco)를 만들어 멸균 후에 실제 pH 값들을 측정하여 배지의 pH로 하였다. 배양온도, pH별 생육량 조사를 위한 배양기간은 역시 Fig. 1의 F와 같이 생육의 휴지기



**Fig. 1.** Effect of incubation period on mycelial growth of 5 isolates *Cy lindrocarpon destructans* [Isolate CY-92-01(A), CY-92-03(B), CY-92-07(C), CY-94-01(D), CY-94-02(E) and mean of the 5 isolates(F)]. Each 20 ml of Czapek-Dox broth adjusted to pH 4.0 with citrate-phosphate (McIlvane) buffer was inoculated with about  $10^3$  conidia of the 5 isolates tested. Inoculated culture was incubated for 20 days at 20°C. Dry weight of mycelium was measured after drying at 75°C for 8 hours and the datum is average of 3 replicates. Vertical bars indicate the standard error.

(stationary phase)에 도달하는 배양 20일 후 조사하였다.

#### 결과 및 고찰

Corn meal agar의 12종의 배지를 공시하여 *C. destructans* CY-92-01 균주를 배양한 결과 Table 2와 같이 Tomato juice agar와 Oat meal agar에서 균총의 색

상은 담회색~암갈색을 나타내었고 Malt extract agar, Gallic acid agar, Potato dextrose agar(PDA)에서 균총은 암갈색~암갈색을 보였다. 반면에 Czapek solution agar(CSA)는 황색 혹은 백색의 균총을 나타내었다. 조 등에 의하면 V-8 juice 배지에서 *C. destructans*가 생육중 후막포자의 생성량이나 크기, 분생포자의 생성량 등이 많으나(조대휘 등, 미발표) 균총의 크기는 CSA 배지에 비해 작게 나타났다. 식물

**Table 2.** Characteristics of mycelial growth of the *Cylindrocarpon destructans* (Isolate CY-92-01) on the media tested<sup>a</sup>

Medium	Color of colony	Grade of growth <sup>b</sup>
Corn meal agar	White	+
Lima bean agar	White	+
Saboraud agar	White	+
V-8 Juice agar	White	++
Tryptic soy agar	White	++
Yeast extract agar	White	+++
Tryptic soy agar	White	++
Czapek soln. agar	Light Yellow or White	++++
Oat meal agar	Dark Gray	+++
Tomato juice agar	Light Gray	+++
Gallic acid agar	Light Brown	+
Malt extract agar	Light Brown	+
Potato dextrose agar	Dark Brown	++

<sup>a</sup>The media were smeared with  $5 \times 10^2$  conidia of *C. destructans* (Isolate CY-92-01) and were incubated for 16 days at 25°C.

<sup>b</sup>Grade index of growth; ++++ (good) > +++ > ++ > + > (poor).

병원성 진균류의 생육배지로서 가장 널리 쓰이는 PDA와 일반 진균류의 포자형성용 배지로 많이 사용하는 V-8 juice agar 등에 대한 보다 확실한 생육량 비교는 각 배지를 액체배지로 조제하여 그 건중량을 측정하여 Table 3의 결과로 알 수 있었는데 Czapek-Dox broth(CDB), Potato dextrose broth(PDB), V-8 broth(VB)의 3가지 액체배지에 5개 *C. destructans* 균주를 배양하여 균사 생육량을 측정하여 CDB에서 생육량이 가장 많았고 그 다음으로는 PDB, VB의 순으로 생육량이 많았다.

따라서 고체배지중 생육이 양호한 것으로 나타난 CSA 배지가 역시 액체배지에서도 *C. destructans*의 균사 생육량이 가장 컸으며 또한 CSA 배지는 화학 합성 배지이므로 앞으로의 여러 생리적 실험에 응용될 배지로 적당할 것이라고 생각된다.

Fig. 1과 같이 배양기간에 의한 *C. destructans* 5개 균주의 생육량 조사결과, 배양 4일 후부터 균주별로 차이를 보여 배양 12~16일까지 급속도의 생육이 나타나며 이후 20~30일까지 완만한 증가를 보였다. 그리고 배양 30일 이후부터 조사기간 50일까지는 감소하는 것으로 나타났다.

**Table 3.** Comparison of Czapek-Dox broth, Potato dextrose broth and V-8 broth on mycelial growth of *Cylindrocarpon destructans*<sup>a</sup>

Isolate	Czapek-Dox broth	Potato dextrose broth	V-8 broth
CY-92-01	165.3± 5.0	179.1± 14.6	118.1± 1.5
CY-92-02	244.4± 2.8	197.6± 4.1	139.5± 8.8
CY-92-07	214.1± 5.0	201.7± 22.3	114.9± 2.7
CY-94-01	266.4± 6.0	189.9± 8.5	137.2± 2.3
CY-94-02	254.6± 4.4	219.8± 1.9	137.8± 2.2
Mean	229.0± 16.2	197.6± 6.0	135.5± 4.1

<sup>a</sup>The media were made with pH 4.0 solution of citrate-phosphate(McIlvane) buffer and inoculated with  $10^3$  conidia/20 ml media of *C. destructans*. Observation was made after 20 days incubation at 20°C and each datum is average standard error of 3 replicates.

5개 균주의 배양기간별 생육량을 평균한 결과(Fig. 1, F)를 보면 배양 4일까지는 접종원인 분생포자가 환경에 적응하면서 발아하여 균사가 미량으로 생육하는 시기로 보여지며 이후 12일까지는 균사의 생육이 활발하여 생육량이 급속도로 증가하였다. 그 이후에는 배양 20일까지 완만한 증가가 있고 이후 큰 변화없는 상태로 배양 30일까지 이어졌으며 30일 이후부터 감소하였다.

이와 같은 결과로 균사 건중량이 300 mg 대에 도달하는 배양기간 20일째가 균사생육이 최고로 도달하는 가장 효율적인 배양 시간으로 나타났다. 그러므로 이후에 연구 검토할 환경요인과 영양소별 생리 특성 연구 등에 적정 배양기간으로 이용될 수 있다고 생각된다.

온도조건에 의한 균사의 생육량 조사는 Fig. 2와 같이 공시 배양온도 5~40°C 중 *C. destructans* 5개 균주 모두가 5~25°C 범위에서 생육되었으며 Fig. 2의 F와 같이 각 균주를 평균한 결과, 20°C에서 최고의 생육량이 나타났고 그 다음으로 15°C와 25°C, 10°C, 5°C의 순으로 생육량이 측정되었다. 그러나 5°C에서는 5개 균주 모두 접종한 분생포자는 발아되었지만 이후 균사생육이 미약하여 생육량을 측정할 수 있는 정도는 아니었으며 30°C 이상의 온도에서는 접종원인 분생포자가 분해되어 생육이 불가능 하였다.

이와 같은 결과는 Taylor<sup>6)</sup>가 2~27°C의 온도 범위에서 생육이 가능하다는 것과 2°C의 낮은 온도에서

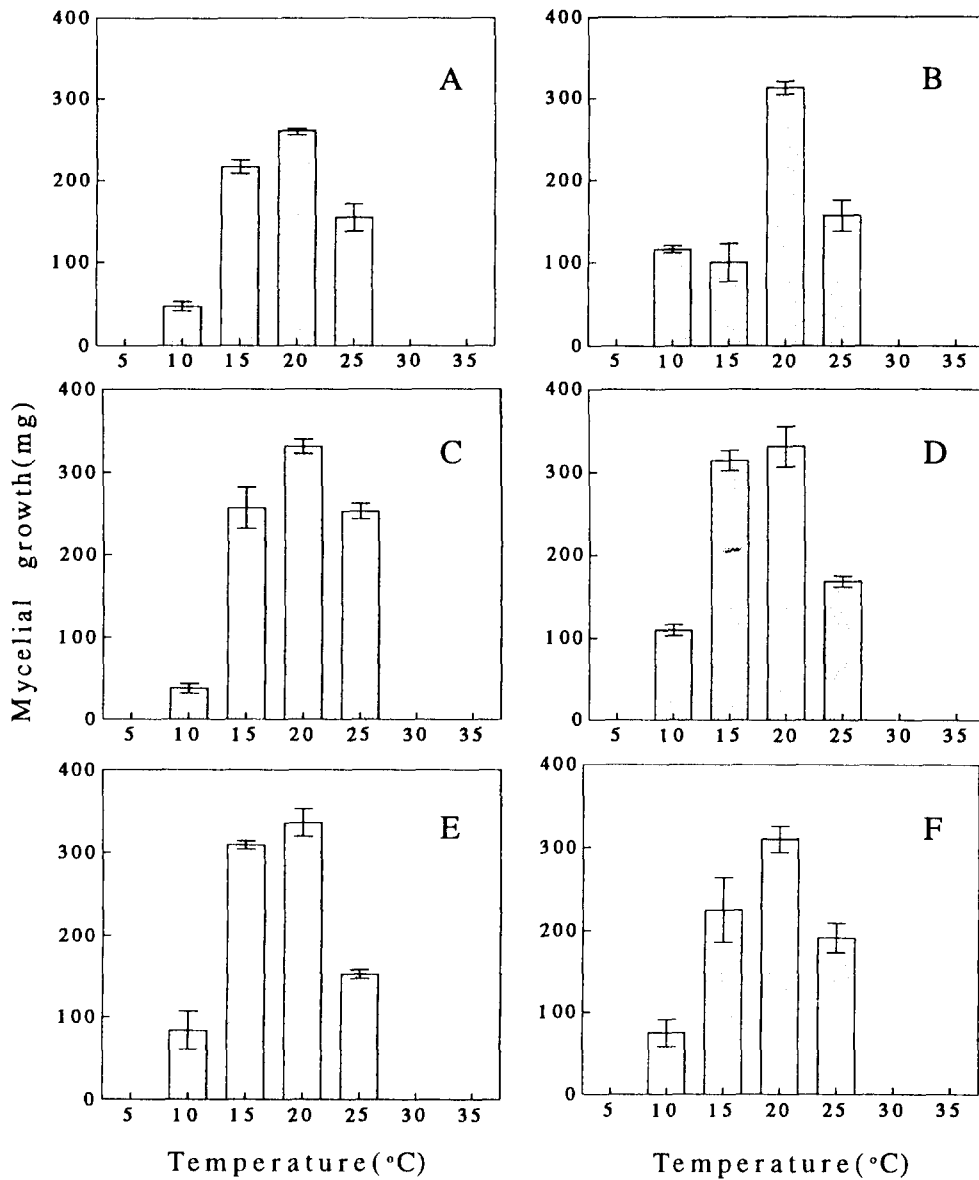
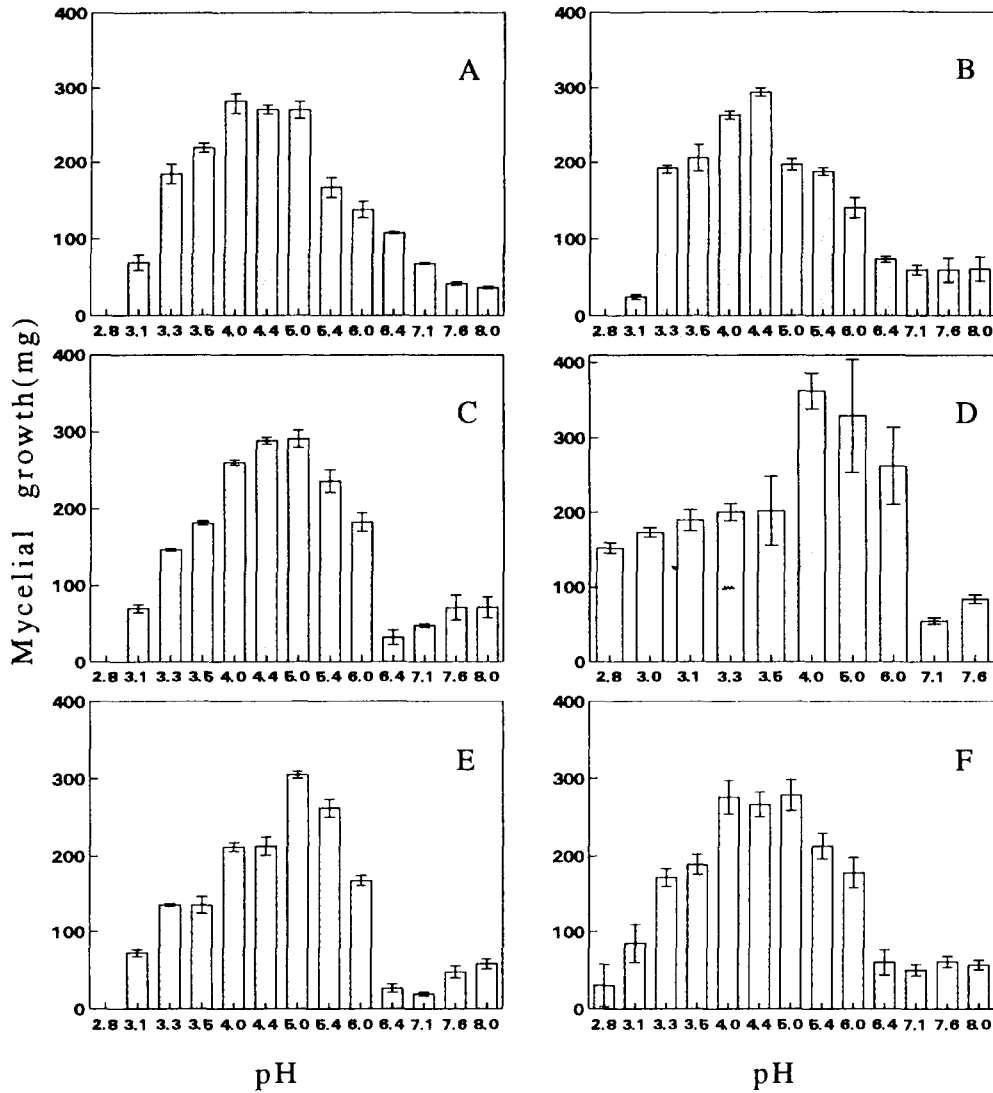


Fig. 2. Effect of temperature on mycelial growth of 5 isolates *Cylindrocarpon destructans* [Isolate CY-92-01(A), CY-92-03(B), CY-92-07(C), CY-94-01(D), CY-94-02(E), mean of the 5 isolates(F)]. Each 20 ml of Czapek-Dox broth adjusted to pH 4.0 with citrate-phosphate (Mcllvane) buffer was inoculated with about  $10^3$  conidia of the 5 isolates tested. Inoculated culture was incubated for 20 days. Dry weight of mycelium was measured after drying at 75°C for 8 hours and the datum is average of 3 replicates. Vertical bars indicate the standard error.

생육정도가 측정되지는 않았지만 미약한 균사 신장이 관찰된다는 보고와 Fig. 2의 결과는 거의 일치하는 경향이였다. 또한 Miyazawa<sup>9)</sup>가 보고한 *C. destructans* 생육가능 온도범위가 3~26°C, 최적온도 22°C라는 것

과 28°C에서는 생육되지 않음을 보고한 것과 거의 일치하였다. 그러나 Chung<sup>10)</sup>이 5~30°C 온도범위에서 생육이 가능하다는 보고로 보아 30°C에서 생육되는 형질이 다른 *C. destructans*가 있는 것인지는 앞으로



**Fig. 3.** Effect of pH on mycelial growth of 5 isolates *Cyindrocarpon destructans* [Isolate CY-92-01(A), CY-92-03(B), CY-92-07(C), CY-94-01(D), CY-94-02(E), mean of the 5 isolates(F)]. Each 20 ml of Czapek-Dox broth adjusted to pHs with citrate-phosphate(McIlvane) buffer was inoculated with about  $10^8$  conidia of the 5 isolates tested. Inoculated culture was incubated for 20 days at 20°C. Dry weight of mycelium was measured after drying at 75°C for 8 hours and the datum is average of 3 replicates. Vertical bars indicate the standard error.

더 많은 균주를 분리하여 연구해야 할 것으로 생각 된다.

배지의 pH에 의한 생육은 Fig. 3과 같이 설정된 pH 범위인 2.8~8.0 사이에서 5개 균주 모두 생육이 가능하였다. 그러나 pH 2.8에서는 5개 균주중 CY-94-01 균주가 생육량이 152.3 mg으로 측정되었으며 다른

균주들은 집중원인 분생포자가 발아하여 균사생육이 관찰되는 정도로서 측정이 가능한 생육량은 아니었다.

공시 균주별 생육 최적 pH는 CY-92-01의 경우 pH 4.0~5.0, CY-92-03은 pH 4.4, CY-92-07은 pH 4.4~5.0, CY-94-01은 pH 4.0~5.0이었고 CY-94-02는 pH 5.0으로서 균주간에 약간의 차이는 있었지만 pH 4.0~5.0

에서 모든 공시 균주가 균사생육의 최적범위로 측정되었다(Fig. 3. F).

따라서 Taylor<sup>6)</sup>가 최적생육에 필요한 배지의 pH가 4.2임을 보고한 내용이 단일 균주의 결과임을 생각할 때 본 연구의 5개 균주를 종합하여 평균한 최적생육 범위 pH인 4.0~5.0의 범위안에 포함되어 그 결과는 일치하는 것으로 판단된다. 그리고 Fig. 3의 F과 같이 최적 pH 범위인 4.0~5.0에서 균사 생육량이 300 mg 정도이며 두번째로 생육이 양호한 범위는 pH 3.3~3.5와 pH 5.4~6.0에서 균사 생육량 200 mg 수준이고 pH 2.8~3.1, pH 6.4~8.0에서는 100 mg에 못 미치는 생육량을 나타냈다.

이상의 결과에서 *C. destructans*는 30°C 이상에서는 분생포자가 전혀 발아되지 않는 생육특성을 보이고 있으며 5°C의 매우 낮은 온도에서 분생포자의 발아가 가능하여 해빙기를 포함한 이른 봄부터 이 병원균의 인삼에 대한 침범이 시작될 수 있을 것으로 예상된다. 그리고 이 병원균의 최적 생육에 필요한 pH가 4.0~5.0의 산성 조건이고 강산성인 pH 2.8에서도 분생포자의 발아와 미약한 균사의 생육이 관찰되어 앞으로 토양이 산성화되는 추세에 따라 더욱 근부병은 기승을 부릴 것으로 생각된다.

따라서 이 병원균에 의한 근부병을 방제하는 것은 물론 병 예방에 도움이 될 수 있도록 재배환경 개선에 관한 연구와 이에 관련된 병원균의 생리적 특성 연구가 앞으로 더욱 심도있게 이루어지고 그 결과가 응용되므로서 인삼의 연작장해가 효과적으로 해소될 수 있도록 해야 할 것이다.

## 요 약

인삼 근부병균 *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten의 지역별 분리균주를 대상으로 배양기간, 온도, pH별 균사 생육량을 조사하였다.

배지를 선정하기 위해 13종의 평판배지에 대해서는 *C. destructans* 1개균주(균주번호 CY-92-01)를 대상으로, Czapek-Dox broth, potato dextrose broth, V-8 broth 등 3가지 액체배지들에서는 5개 균주(균주번호 CY-92-01, CY-92-03, CY-92-07, CY-94-01, CY-94-02)에 대해서 생육량을 조사한 결과, 각각 Czapek solution agar, Cza-

pek-Dox broth 에서 균사 생육량이 가장 많아서 본 연구의 생리적 특성 실험에 사용할 배지로 선정하였다.

*C. destructans*의 5개 분리 균주에 대한 배양기간, 온도, pH별 균사 생육량 조사 결과, *C. destructans*는 배양 12일까지 급속도로 생육하고 이후 서서히 증가하여 배양 20일째 생육량이 최고에 도달하였다. 그리고 20일 후 30일 까지의 배양기간에는 생육량에 큰 변화가 없으나 배양 30일후에는 서서히 감소하는 경향이였다. 생육가능 온도범위는 5~25°C로 생육 최적 온도는 20°C 이었으며, 그 다음으로는 15°C, 25°C, 10°C, 5°C의 온도조건 순으로 생육되었다. 5°C의 경우에는 20일간 배양 후 균사생육이 관찰되나 측정이 불가능 할 정도의 미약한 생육량이었다. 그리고 30°C 이상의 온도에서 생육이 불가능하였다. pH별 생육에 있어서는 조사된 pH 2.8~ 8.0의 모든 범위에서 생육이 가능하였다. 생육에 필요한 최적 pH는 4.0~5.0의 범위이었고 pH 3.3~3.5, pH 5.4~6.0에서 생육량이 그 다음 순으로 측정되었다. pH 2.8에서는 미약한 균사생육이 관찰되었다.

## 인 용 문 헌

1. 松尾卓見, 宮澤洋一: 日本植病報 **35**, 356 (1969).
2. 홍순근, 오승환, 유연현, 김기황, 조대휘: 인삼연구보고서(재배분야), 한국인삼연구연구원, p121 (1992).
3. 조대휘, 박규진, 유연현, 오승환, 이호자: 고려인삼학회지, **19(2)**, 175 (1995).
4. Scholten, G.: *Neth. J. Plant. Path.* **70**, suppl. 2, 61 (1964).
5. Atkinson, R. G.: *Can. J. Botany.* **39**, 1531 (1961).
6. Taylor, G. S.: *Trans. Br. mycol. Soc.* **47(3)**, 381 (1964).
7. Evans, G. and White, N. H.: *Trans. Br. mycol. Soc.*, **49(3)**, 563 (1966).
8. Miyazawa, Y.: *Nogyo oyobi Engei* **45**, 1279 (1970).
9. Chung, H. S.: *Rept. Tottori Mycol. Inst.* (Japan) **12**, 127 (1975).
10. 유연현, 오승환, 김기황, 조대휘: 인삼연구보고서(재배분야), 한국인삼연구연구원, p. 104 (1993).
11. 유연현, 오승환, 김기황, 박규진, 조대휘: 인삼연구보고서(재배분야), 한국인삼연구연구원, p. 103 (1994).
12. England, L. and Roth, L. F.: *Phytopathology* **70**, 650 (1980).