

국내산 야채주스의 역병균 영양생장 및 생식생장용 배양기 이용

지형진* · 조원대 · 최용철
농업과학기술원 작물보호부 식물병리과

Utilization of Domestic Vegetable Juices as a Medium for Growth and Reproduction of *Phytophthora* species

Hyeong-Jin Jee*, Weon-Dae Cho and Young-Chul Choi

Division of Plant Pathology, Department of Crop Protection,
National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT: V8 juice agar (V8A) has been the most popular and commonly used medium for growth and reproduction of *Phytophthora*. However, frequently V8 vegetable juice is not available or difficult to obtain in Korea. We therefore developed widely accessible medium to substitute for V8A using domestically available five juices; two carrot (KCJA), two tomato (KTJA) and a vegetable-mix (KVMA). To prepare 10% juice medium, each vegetable juice 100 ml, DW 900 ml, agar 17 g and CaCO₃ 0.5-1.0 g were supplemented to adjust pH ca. 6.0. Mycelial growth of *P. cactorum* and *P. capsici* on KTJA and KVMA was equally effective as V8A in dark, however, KCJA, KTJA and KVMA was slightly better or insignificantly different from V8A for the growth of *P. cactorum*, *P. capsici*, *P. drechsleri* and *P. nicotianae* under light. Sporangial production of *P. cactorum*, *P. capsici* and *P. nicotianae* on KTJA and KVMA was as good as V8A and slightly better than KCJA, but the difference was insignificant by *P. cactorum* and *P. nicotianae*. The four fungi successfully formed oospores on all the media although the numbers were varied among species and media. While KTJA was the best for *P. cactorum* and *P. capsici*, V8A was the best for *P. capsici* and *P. drechsleri*. However, KCJA stimulated highest number of oospores of *P. nicotianae*. Overall results showed that domestically available vegetable juices were highly effective on growth and reproduction of *Phytophthora* and comparable to V8 juice. Therefore, the domestic juice medium can be successfully replaced V8A in *Phytophthora* study.

Key words: *Phytophthora*, growth, reproduction, juice medium.

*Phytophthora*속 균은 전 세계적으로 분포하며 거의 모든 식물을 침해하는 가장 중요한 토양전염성 병원균중 하나로 국내에도 15종의 역병균이 각종 채소 작물과 과수에 발생하여 해마다 많은 피해를 주고 있다(1, 3).

역병균의 특성조사와 병원학적 연구를 위해서는 역병균이 잘 자라고 유주자낭 및 난포자형성이 용이한 배양기를 사용하는 것이 필수적이거나 역병균은 일반 진균용 배양기로 가장 널리 사용되는 감자한천배지(potato dextrose agar, PDA)에서는 생육이 지연될 뿐만 아니라 생식기관들이 잘 형성되지 않고, 귀리한천배지(oat meal agar, OMA)는 불투명하여 균체 관찰이 어렵다(1, 3). *Phytophthora* 및 *Pythium* 연구에는 옥수수한천배지(corn meal agar, CMA), 당근주스한천배지(carrot juice agar, CJA), V8 주스한천배지(vegetable 8 juice, V8A) 등이 주로 사용되고 있으나, V8A가 역병균의 균사 생장 및 생

식기관 형성에 가장 효과적이기 때문에 세계적으로 가장 많이 이용되고 있다(1, 2, 5, 8). 하지만, V8 주스는 미국산으로(Campbell Soup Co. Camden, NJ, USA) 국내 및 개발 도상국에서는 구입이 용이하지 못하여 역병균류 연구에 애로를 겪는 경우가 종종 있다(2, 3).

본 연구는 이러한 문제를 해결하기 위해서 국산 제품으로 손쉽게 구입 할 수 있는 여러 가지 야채 주스들을 이용하여 배양기를 조성하였을 때 역병균의 균사 생장과 유성 및 무성 포자형성에 미치는 영향을 V8 주스한천배지와 비교 검토하여 역병균류 연구용 국내산 야채주스배지를 개발 할 목적으로 수행하였다.

재료 및 방법

야채주스 및 배양기 조성 방법. 시중에서 쉽게 구입할 수 있는 야채 주스중 당근 주스 2종, 토마토 주스 2종, 야채믹스 주스 1종 등을 V8 주스와 함께 실험에 공시하였다(Table 1). 각각의 10% 주스 배양기는 주스 100 ml,

*Corresponding author.

**농업과학기술원 승인번호 : 98-3-2-58

증류수 900 ml, 한천(Bactor agar) 17 g에 CaCO₃를 Table 1에 기록된 양으로 첨가하여 pH를 약 6.0으로 보정하였다. 잘 혼합된 배지를 121°C에서 15분간 살균하고 약 50°C로 식힌 다음 직경이 9.0 cm인 1회용 Petri dish에 피펫을 이용하여 20 ml씩 분주하였다.

사용균주. 농업과학기술원 병리과에서 보존중인 4종의 역병균을 본 실험에 이용하였다. 자웅동주균인 *Phytophthora cactorum*(Pb-9)은 경북안동의 사과에서 분리되었으며(4), 자웅이주균인 *P. capsici* 유성생식형 A1(Pa-11)과 A2(Pa-14)는 경북 청송과 영양의 고추에서, *P. drechsleri* A1(P-9615)과 A2(P-9733)는 각각 고령의 토마토와 공주의 오이에서, *P. nicotianae* A1(P-9680)과 A2(P-9516)는 각각 청양의 구기자과 화성의 계발선인장에서 분리되었다. 모든 균주는 1995년부터 1997년 사이에 수집되었으며 각 균주는 1개의 유주자로부터 유래되었다.

균사생장, 유주자낭형성 및 난포자형성. 10% V8 juice agar에서 4일간 자란 역병균의 가장자리에서 직경 7 mm인 cork borer로 균체 조각을 떼어낸 다음 각각의 주스 배양기 중앙에 접종하고 암상태 혹은 빛이 조사된 24°C 항온기에 두어 24시간마다 7일간 균사 생장 속도를 조사하였다. 역병균의 유주자낭 형성 실험은 역병균을 각각의 10% 주스 배양기에 4일간 배양한 다음 살균수를 10 ml씩 첨가하고 멸균된 붓으로 균총 표면을 골고루 가볍게 문지르고 물을 버린 후 형광등이 조사된(약 10,000 Lx) 24°C 항온기에서 48시간 동안 다시 배양하였다. 평판 배지당 살균수 20 ml씩 첨가한 후 다시 멸균된 붓으로 균총 표면을 긁은 다음 네겟의 가아제로 걸러서 유주자낭을 수집하였으며 유주자낭의 총수는 Ko 등의(6) micro-syringe법으로 측정하였다. 유주자낭 현탁액을 잘 흔든 다음 자동피펫으로 10 µl를 취하여 slide glass위에 떨어뜨리고 45배 혹은 100배 현미경 시야에서 유주자낭 수를 조사하여 배양기 ml당 유주자낭 형성수를 계산하였다. 난포자 형성 실험은 각각의 10% 주스배양기에 *P. cactorum*(Pb-9)은 단독으로, *P. capsici*, *P. drechsleri*, *P. nicotianae*는 각각의 유성생식형 A1과 A2 균주를 배양기

별로 A1은 5개, A2는 4개 지점에 접종하여 암상태의 20°C 항온기에서 14일간 배양하였다. 배양기에 형성된 난포자수를 측정하기 위해서 살균수 180 ml에 한 개의 평판배지를 잘라 넣고 균질기(Nissei AM-11 Homogenizer)로 8,000 rpm에서 약 30초 정도 배지를 마쇄하였다. 배양기 마쇄액을 200 ml로 조절한 다음 위와 같은 방법으로 각각의 주스 배양기 1 ml당 형성된 난포자수를 측정하였다. 모든 실험은 2회 이상 반복하였으며 처리별로 3개의 plate를 사용하였다. 처리별 통계적 유의차는 Tukey-Kramer HSD(Honestly Significantly Different) 방법으로 5% 수준에서 조사하였다.

결 과

실험에 사용된 야채 주스의 pH는 3.8과 4.4 사이였는데, 그 중 야채믹스의 pH가 3.8로 가장 낮았고 V8 juice는 4.4로 가장 높았다. 10% 주스 배양기 조성시 pH를 약 6.0으로 조절하기 위해서 1,000 ml 당 당근농장, 제주당근, 그린힐토마토, 후디스토마토 주스배지에는 0.4~0.6 g, 야채믹스와 V8 주스에는 각각 1.4와 1.0 g씩 CaCO₃를 첨가하였다(Table 1).

*P. cactorum*의 균사 생장은 암조건에서는 4.1~5.2 mm/24h 정도로 당근 주스 배양기 보다는 토마토주스배지, 야채믹스배지, V8 주스 배양기 등에서 다소 우수하였으나, 광조건에서는 국내산 토마토 및 야채믹스 배양기가 V8 주스 배양기보다 균사 생장이 유리한 것으로 나타났다. *P. capsici*의 경우 암조건에서는 제주당근 주스 배양기를 제외한 모든 배양기에서 균사 생장 속도가 비슷하였는데 광조건에서는 국내산 당근 및 토마토 주스 배양기가 V8 주스보다 균사생장이 우수하였다(Table 2). *P. drechsleri*의 경우 암조건에서는 V8 주스 배양기가 우수하였으나 광조건에서는 국내산 당근 및 토마토 주스 배양기가 우수하였다. *P. nicotianae*의 경우에도 암조건에서는 V8 주스 배양기가 가장 우수하였지만 광조건에서는 제주당근 및 야채믹스 배양기에서 다소 우수하였다(Table 2).

Table 1. Source and ingredient of the vegetable juices used in this study

Vegetable juice medium ^a	Brand name of vegetable juice	Original pH	CaCO ₃ (g) ^b	Ingredient
KCJA1	Dangeon-nongjang (당근농장)	4.23	0.4	Carrot 100% (Cheju)
KCJA2	Cheju-dangeon (제주당근)	4.38	0.6	Carrot 100% (Cheju)
KTJA1	Greenhill tomato (그린힐토마토)	4.02	0.4	Tomato 66%, liquefied fructose, citric acid, vitamin C
KTJA2	Foodis tomato (후디스토마토)	4.31	0.5	Tomato 80%, liquefied fructose, citric acid, vitamin C
KVAM	Vegetables mix (야채믹스)	3.80	1.4	Carrot 45%, orange 25%, apple, tomato paste, liquefied fructose
V8A	V8 juice	4.44	1.0	Tomato, carrot, beet, watercress, parsley, lettuce, spinach, selery

^a Abbreviations stand for Korean Carrot Juice Agar (KCJA), Korean Tomato Juice Agar (KTJA), and Korean Vegetable Mix Agar (KVMA).

^b Amount of CaCO₃ supplemented to 1.0 l of 10% juice medium to adjust pH 6.0.

Table 2. Mycelial growth of *Phytophthora* species on various 10% domestic vegetable juice media in comparison with V8 juice agar

Vegetable juice medium ^a	Mycelial linear growth at 24 C (mm/24 h)							
	<i>P. cactorum</i> ^b		<i>P. capsici</i>		<i>P. drechsleri</i>		<i>P. nicotianae</i>	
	Dark	Light	Dark	Light	Dark	Light	Dark	Light
KCJA1	4.1A ^c	4.0A	7.4B	7.0C	5.3A	5.3AB	4.3A	4.8AB
KCJA2	4.5A	3.7A	6.4A	7.0C	5.4A	6.1B	4.1A	5.1B
KTJA1	5.0B	4.5AB	7.0B	5.9B	5.1A	5.0A	4.6A	4.2A
KTJA2	5.2B	4.6B	7.0B	5.3B	5.3A	5.6B	5.1AB	4.8AB
KVMA	5.4B	4.8B	7.4B	4.5A	5.8AB	4.6A	4.2A	5.6C
V8A	5.2B	3.5A	7.5B	4.1A	6.5B	4.9A	5.9B	4.6AB

^aRefer to Table 1.

^bIsolates used for mycelial growth: *P. capsici* (Pa-11), *P. cactorum* (Pb-9), *P. drechsleri* (P-9733), *P. nicotianae* (P-9680).

^cValues followed by the same letter in each column were not significantly different at $\alpha=0.05$ by Tukey-Kramer HSD.

Table 3. Sporangial production of *Phytophthora* species on various 10% domestic vegetable juice media in comparison with V8 juice agar

Vegetable juice medium ^a	No. of sporangia produced/ml of medium ($\times 10^3$)			
	<i>P. cactorum</i> ^b	<i>P. capsici</i>	<i>P. drechsleri</i>	<i>P. nicotianae</i>
KCJA1	5.5A ^c	7.5A	0	18.5A
KCJA2	6.3A	5.3A	0	15.0A
KTJA1	5.8A	15.5B	0	23.0A
KTJA2	11.3A	24.1C	0	24.5A
KVMA	12.5A	27.2C	0	27.5A
V8A	12.3A	27.0C	0	26.5A

^aRefer to Table 1.

^bIsolates used for sporangial production: *P. capsici* (Pa-11), *P. cactorum* (Pb-9), *P. drechsleri* (P-9733), *P. nicotianae* (P-9680).

^cValues followed by the same letter in each column were not significantly different at $\alpha=0.05$ by Tukey-Kramer HSD.

*P. drechsleri*는 고형배양기에서 유주자낭을 형성하지 않고 물속에서만 유주자낭을 형성하는 균으로(1, 3, 8) 본 실험 방법으로는 유주자낭을 형성하지 않았다. 기타 3종의 역병균은 모든 주스 배양기에서 다량의 유주자낭을 형성하였는데 배양기 별로 최저 5.5×10^3 /ml에서 최고 27.5×10^3 /ml 정도의 유주자낭을 형성하였다(Table 3). 당근 주스 보다는 토마토 주스, 야채믹스, V8 주스 등의 배양기에서 모든 균주의 유주자낭 형성이 많았는데, *P. cactorum*과 *P. nicotianae*의 경우에는 배양기별로 통계적으로 유의차가 인정되지 않았다(Table 3).

실험에 공시한 모든 주스 배양기에서 4종의 역병균은 대량의 난포자를 형성하였다(Table 4). *P. cactorum*은 후디스 토마토 주스 배양기에서 난포자 형성이 가장 많았으며 다음은 V8 주스, 야채믹스, 당근농장, 제주당근 주스 배양기 순이었는데 형성된 난포자수는 ml당 $2.1 \sim 3.1 \times 10^6$ 개 정도였다. *P. capsici*의 경우에는 V8 주스 배양기와 2종의 토마토 주스 배양기에서 난포자 형성이 많았으며 2종의 당근주스와 야채믹스에서는 다소 적었다. *P. dre-*

Table 4. Oosporangial production of *Phytophthora* species on various 10% domestic vegetable juice media in comparison with V8 juice agar

Vegetable juice medium ^a	No. of sporangia produced/ml of medium ($\times 10^3$)			
	<i>P. cactorum</i> ^b	<i>P. capsici</i>	<i>P. drechsleri</i>	<i>P. nicotianae</i>
KCJA1	2,773AB ^c	42.3AB	57.9B	20.4B
KCJA2	2,233AB	36.7A	43.5B	12.9A
KTJA1	2,133A	47.3AB	66.3B	10.5A
KTJA2	4,013C	49.0B	78.0B	10.2A
KVMA	3,033B	31.7A	23.1A	7.5A
V8A	3,120B	49.0B	97.7C	11.4A

^aRefer to Table 1.

^bIsolates used for oospore formation: *P. cactorum* (Pb-9, homothallic), *P. capsici* (Pa-11 A1 \times Pa-14 A2), *P. drechsleri* (P-9615 A1 \times P-9733 A2), *P. nicotianae* (P-9680 A1 \times P-9516 A2).

^cValues followed by the same letter in each column were not significantly different at $\alpha=0.05$ by Tukey-Kramer HSD.

*chsleri*의 난포자는 V8 주스 배양기에서 가장 많았으며 다음은 후디스 토마토 주스 배양기였다. *P. nicotianae*는 당근농장 주스 배양기에서 난포자 형성이 가장 우수한 반면 나머지 배양기에서는 비슷하였다(Table 4).

고 찰

V8 주스는 8종의 야채를 갈아 만든 미국산 음료로 1955년에 Miller(7)가 최초로 진균 및 세균용 배양기로 활용한 이래 현재는 *Phytophthora*속 균 뿐만 아니라 일반 곰팡이 연구용 배양기로 세계적으로 널리 이용되고 있다(1, 8). 하지만, 국내에서는 V8 주스가 잘 유통되지 않으므로 구입이 어렵기 때문에 역병균류 연구에 애로를 겪는 경우가 종종 있다(3). Guo와 Ko(2)는 V8 주스 배양기를 대체 할 목적으로 토마토 과일을 갈아서 배양기를 조성하였는데 *Phytophthora*와 *Pythium*속 균의 생장 및 생식 정도는 V8 주스 배양기와 비슷하거나 우수한 것으로 나타나 V8A 대체 배양기로 이용할 수 있다고 하였다.

하지만, Guo와 Ko의 토마토 배양기를 만들기 위해서는 항상 신선한 토마토가 필요 할 뿐만 아니라 토마토를 갈고 체로 거르는 등의 귀찮은 정제과정과 시간이 걸리는 단점이 있다.

본 실험에 공시한 5종의 야채 주스는 국내 어느 곳에 서든지 손쉽게 구입 할 수 있을 뿐만 아니라 1.5 l 용기로 구입하면 V8 주스 가격의 약 1/2 정도이며 역병균류 배양기로 사용할 경우에는 V8 주스 배양기 보다 깨끗하고 투명하여 역병균의 생식기관 관찰과 균체 촬영에 훨씬 유리하다. 실험에 공시한 역병균의 종과 균주에 따라 다소 상이한 결과를 나타내기도 하였지만, 역병균의 균사 성장과 유주자낭 형성은 토마토 주스가 당근 주스 보다 다소 우수하였고 V8 주스와는 비슷하였다. 역병균의 난포자 형성은 뚜렷한 경향이 없는 대신 모든 배양기에서 대량으로 형성되었다. 이상의 결과로 볼 때, 국내산 야채 주스는 역병균의 균사 성장과 유·무성 생식기관 형성에 매우 효과적이므로 역병균류 연구용 배양기로 매우 적합한 것으로 판단된다. 하지만, 역병균은 배양기의 종류에 따라 유주자낭과 난포자의 크기 및 형태가 다르게 나타날 수 있기 때문에(1, 3, 8) 역병균의 분류 동정시에는 배양기의 표준화가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

*Phytophthora*속 균의 성장과 생식 연구에는 V8 주스 배양기(V8A)가 가장 널리 사용되고 있으나 국내에서는 V8 주스 구입이 용이하지 않다. 본 실험은 국내산 당근 주스 2종과 토마토 주스 2종 그리고 야채믹스 1종 등을 이용하여 V8A 대체 배양기를 개발하고자 실시하였다. 10% 야채 주스 배양기는 주스 100 ml에 살균수 900 ml와 한천 17 g을 혼합한 다음 pH를 약 6.0으로 조절하기 위하여 CaCO_3 0.4~1.4 g을 첨가하여 조성하였다. 암상태에서 *P. cactorum*과 *P. capsici*의 균사생장은 토마토 주스, 야채믹스, V8 주스 배양기에서 비슷하였고, 광조건에서는 위의 두 균 및 *P. drechsleri*와 *P. nicotianae*의 균사생장이 5종의 국내산 야채주스 배양기에서 V8A 보다 다

소 빠르거나 비슷하였다. *P. drechsleri*를 제외한 3균의 유주자낭 형성수는 토마토 주스, 야채믹스, V8A 배양기에서 비슷하였으며, 당근주스 배양기에서는 다소 적은 경향이였다. 하지만, *P. cactorum*과 *P. nicotianae*의 유주자낭 형성수는 배양기별로 통계적 유의차가 없었다. 난포자 형성수는 역병균의 종류와 배양기에 따라 다소 차이가 있으나 4종의 역병균은 모든 공시 배양기에서 다량의 난포자를 형성하였다. *P. cactorum*은 토마토 주스 배양기에서, *P. capsici*와 *P. drechsleri*는 V8A에서, *P. nicotianae*는 당근 주스 배양기에서 난포자 형성수가 가장 많았다. 이상의 결과로 볼 때, 국내산 야채 주스 배양기는 *Phytophthora*속 균의 균사생장과 유·무성 생식기관 형성에 매우 효과적으로 V8 주스 배양기를 대체하여 역병균류 연구에 활용 할 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press. St. Paul, Minnesota. 562pp.
2. Guo, L. Y. and Ko, W. H. 1993. Two widely accessible media for growth and reproduction of *Phytophthora* and *Pythium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(7):2323-2325.
3. 지형진. 1998. *Phytophthora*속 균의 특성 및 분류. 식물병과 농업 4(1):79-89.
4. Jee, H. J., Cho, W. D and Kim, W. G. 1997. *Phytophthora* diseases of apple in Korea: II. Occurrence of an unusual fruit rot caused by *P. cactorum* and *P. cambivora*. *Korean J. Plant Pathol.* 13(3): 145-151.
5. Ko, W. H. 1988. Hormonal heterothallism and homothallism in *Phytophthora*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:57-73.
6. Ko, W. H., Chase, L. L. and Kunitomo, R. K. 1973. A microsyringe method for determining concentration of fungal propagules. *Phytopathology* 65:1206-1207.
7. Miller, P. M. 1955. V-8 juice as a general-purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopathology* 45:461-462.
8. Rebeiro, O. K. 1978. A source book of the genus *Phytophthora*. J. Cramer, Braunschweig, Germany. 417.

(Received July 15, 1998)