

## 초음파처리에 의한 인삼 뿌리썩음병균 *Cylindrocarpon destructans* 후막포자의 분리

조대휘# · 유연현

한국인삼연초연구원  
(2000년 5월 18일 접수)

### Effect of Ultrasonic treatment on the Isolation of the Chlamydo-spores of *Cylindrocarpon destructans* Causing Root rot of *Panax ginseng*

Dae-Hui Cho# and Yun-Hyun Yu

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, 434 Dangsu-Dong, Kwonsun-Ku, Suwon 441-480, Korea  
(Received May 18, 2000)

**Abstract :** Chlamydo-spores were isolated from hyphae of *Cylindrocarpon destructans* by homogenization and/or ultrasonic treatment. Rate of the isolated chlamydo-spores by the homogenization with glass tissue grinder were 9.8% of all total chlamydo-spores formed in the culture of *C. destructans*. The length of mycelial fragments after the homogenization was about 400  $\mu$ m. They were, however, formed in clusters of the chlamydo-spores and the mycelia. The rate of the isolated chlamydo-spores from additional ultrasonic treatment after the homogenization of the mycelia were 74.3%. The length of mycelial fragments with the ultrasonic treatment was about 20  $\mu$ m and chlamydo-spores seemed to be isolated from the mycelial mats and dispersed evenly in the culture. The numbers of chlamydo-spore in a catena were 1 to 8 cells after the homogenization on potato dextrose agar (PDA). Meanwhile the numbers of them after added ultrasonic treatment were 1 to 4 cells. Germination percentages of the isolated chlamydo-spores from the ultrasonic treatment were 46.8% after incubation of 2 days on PDA at 20°C and 60.7% after incubation of 13 days at 5°C, respectively. Germination rate of chlamydo-spores to the total chlamydo-spores produced by the ultrasonic treatment was 55.8%. However, it was increased to 74% when it was measured in the germinated catenae to the total catenae.

**Key words:** Homogenization, ultrasonic treatment, chlamydo-spore isolation, *Cylindrocarpon destructans*.

## 서 론

인삼 연작장애의 원인균으로 알려진 뿌리썩음병균 *Cylindrocarpon destructans*<sup>1,2,3)</sup>의 후막포자는 토양내에서 월동을 통해 오랜 기간동안 존재하면서 인삼의 뿌리를 침입하는 전염원으로 존재한다.<sup>4,5)</sup> 따라서 인삼의 연작장애를 해소하거나 적정 재배 예정지를 선정하기 위해서는 이 병원균의 후막포자에 관한 생리학적, 병리학적인 연구결과를 토대로 병원균의 방제는 물론 토양내 병원균의 밀도를 측정할 수 있는 선택배지의 개발이 필요하게 되었다. 이를 위해서는 후막포자의 생성과 분리에 관한 기초연구가 필요하여 최근 C.

*destructans*의 후막포자 생성에 관한 연구가 보고<sup>4,5,6,7)</sup>되었으나, 후막포자 생성후 균사체로부터 후막포자를 대량으로 분리하는 방법에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

후막포자는 일부 *Fusarium* 속의 대형분생포자로부터 형성되는 것이 관찰되어 보고된 바 있는 데,<sup>8,9)</sup> 최근 미국삼의 뿌리썩음조직에서 분리한 *C. destructans*에서도 광배양을 통해 대형분생포자 형성을 유도하고 이로부터 변형된 후막포자의 생성이 확인되었다.<sup>6)</sup> 그러나 한국산 인삼의 뿌리썩음증상에서 분리한 *C. destructans* 균주의 경우, 광배양을 통해 대형분생포자의 생성이 유도되었으나 대형분생포자가 후막포자로 변형되는 것이 관찰되지 않았다.<sup>7)</sup> 균사체 변형 후막포자의 분리를 위한 연구로 Darmono등<sup>10)</sup>은 *Phytophthora cactorum*의 균사체를 냉동시킨후 해동처리를 통해 균사체의 세포를 파괴하므로써 후막포자만을 분리한 보고가 있다. 그러나 한국산 인삼의 뿌리썩음증상에서 분리한 *C. destructans* 균주들

# 본 연구에 대한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 031-419-4131; (팩스) 031-419-9434  
(E-mail) daehui99@gr.kgttri.re.kr

의 경우에는 모두  $-70^{\circ}\text{C}$ 의 냉동 과 해동과정에도 균사체는 파괴되지 않고 생존하였다.<sup>6)</sup> 액체 진탕배양을 통해 *C. destructans*의 균사체변형 후막포자를 분리한 보고<sup>11)</sup>가 있으나 잔존한 균사체를 제거하는 방법은 아직까지 보고되지 않고 있다. 따라서 균사체를 1차로 homogenization 처리한 후 2차로 초음파 처리를 부가 실시하여 후막포자에 손상이 가해지지 않으면서 균사체를 더욱 세부적으로 절단하므로써 후막포자가 혼합물내에 고르게 분포되어 배지에 접종시 발아 특성등의 관찰이 용이하게 이루어 질 수 있는 방법을 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시균주

1998년 5월 6일 한국인삼연초연구원 수원시험장 인삼 연작지(1993년 인삼 6년근 채굴 후 1년간 예정지 관리, 1995년 묘삼식부)의 5년생 뿌리썩음 증상에서 분리한 인삼 뿌리썩음병균 *Cylindrocarpon destructans*(균주번호 CY-9801)를 사용하였다. 균접종을 위해 potato dextrose agar(PDA, Difco社) 배지에 2주일간  $20^{\circ}\text{C}$ 에서 배양한 균사체를 사용하였다.

### 2. *C. destructans*의 후막포자 생성

인삼 뿌리썩음병균 *C. destructans*의 후막포자 생성촉진을 위해서 조등의 방법<sup>7)</sup>과 같이 공시균주인 *C. destructans*(균주번호 CY-9801)의 분생포자를 PDA에 도말한 후  $20^{\circ}\text{C}$ 에서 10일간 배양시켜 직경 9 cm의 petri dish 배지상면에 균사체를 완전히 생육시켰다. 생육된 기중균사를 제거하기 위해서 배지상면에 0.1 ml의 멸균수를 떨어뜨린 후 유리봉으로 여러 번 문질러서 배지상면에 기중균사가 완전히 밀착되도록 하였다. 그리고 이 생육배지의 petri dish를 paraffin film으로 밀봉하여  $20^{\circ}\text{C}$ 의 항온기에서  $180 \mu\text{mols/m}^2 \cdot \text{sec}$  로서 약 60일간 광배양하여 후막포자 생성을 유도하였다.

### 3. *C. destructans*의 후막포자 분리를 위한 초음파 처리

*C. destructans*의 후막포자가 형성된 배지의 절편을 약  $4 \text{ cm}^2$  정도 취하여 30 ml 용량의 glass tissue grinder(Wheaton No. 358049, U. S. A)의 용기에 넣고 멸균수를 20 ml 넣었다. 이를 homogenizer[Wheaton No. 903475, overhead stirrer, U.S.A, Speed range: 1,000~10,000 rpm(no load)] scale 4에서 10초간 homogenization으로 전처리 한 후 이 혼합액 10 ml을 50 ml 용량의 tube에 넣었다. 이 tube는 비이커에 넣어두고 tube 주위는 얼음을 사용하여 냉각시키면서 ultrasonic processor(Cole-Parmer 4710 series, U.S.A, 20 kcycles/second)를 사용하여 처리조건으로 amplitude:

100 scale, pulser: 6초(duration: 1초), 방출 최대: 18 watts/ $\text{cm}^2$ 로서 초음파 처리하였다. 이때 처리시간은 10~90초 범위에서 10초 간격으로 구분하여 처리하였다.

### 4. *C. destructans* 후막포자의 발아율 측정

위와같이 *C. destructans*의 균사체와 후막포자가 생육된 배지절편에 대해서 초음파 처리한 후 현미경 검경을 통해 절단된 균사체의 길이 및 혼합물내의 분포상태등을 조사하였다. 또한 처리후 균사체로부터 분리되거나 분리되지 않은 후막포자, 그리고 기계적 처리에 의해 손상되어 분열된 후막포자의 비율을 조사하였다. 분리된 후막포자중에서는 사슬을 구성하는 각 후막포자의 갯수별 분리비율을 측정하여 초음파 처리 전과 비교하였다. 또한 분리된 후막포자의 발아율 측정을 위해 Czapek solution agar[(CSA), 미국, Difco社], 혹은 potato dextrose agar[(PDA), 미국 Difco社]에 위와 같이 homogenization의 전처리후 초음파 처리(처리조건: 상동)를 90초간 실시하였고 분리된 후막포자를 도말하여  $5^{\circ}\text{C}$ 에서 13일간,  $20^{\circ}\text{C}$ 에서 2일간으로 각각 배양하면서 발아율을 비교하였다. 이때 배지에는 세균오염을 억제하기 위해 streptomycin sulfate 100 ppm과 rose bengal 50 ppm을 첨가한 후 사용하였다.<sup>12)</sup> 그리고 PDA와 CSA 배지별로 *C. destructans* 후막포자의 발아를 비교하였다. 이때 균사체의 homogenization 및 초음파처리과정으로 분리된 후막포자를 배지상면에 도말하였을 때 각 분리된 후막포자의 단일세포 및 복수 세포들의 연쇄상균을 구분하지 않고 전체 후막포자 세포수에 대한 발아율을 측정한 것과 후막포자 단일세포군과 여러개의 후막포자 세포들의 연쇄상균 각각을 하나의 단위로 구분하여 독립화된 각 단위에서 1개이상의 후막포자가 발아하였을 때 각 단위는 발아한 것으로 구분하여 조사하였다.

## 결과 및 고찰

기존방법인 homogenization으로 근부병균 균사체를 분쇄하는 방법<sup>4)</sup>은 Table 1과 같이 균사체 절편길이는 약  $400 \mu\text{m}$ 이고 용액내에 복잡하게 뭉쳐있으며(Plate 1A) 후막포자의 순수분리율은 9.8%로 매우 낮았다(Table 2). 그러나 homogenization으로 전처리 후에 초음파 처리를 부가하여 실시한 결과, 처리시간 20초 경과부터 분쇄된 균사체는 용액내에 고루 분포되었고 90초간 초음파 처리후에는 균사체 길이는  $20 \mu\text{m}$  정도가 되었으며 전체 후막포자중에서 74.3%의 후막포자가 균사체로부터 분리되므로써 분리비율이 상당히 높았다(Plate 1B). 그리고 이런 방법으로 분리된 후막포자는 후막포자 발아조사등 특성을 관찰하기에 용이한 상태로 분산되어 있었으며 후막포자외에 잔존된 균사체는 대부분 분쇄된

**Table 1.** Effect of ultrasonic treatment on split of mycelial mat of *Cylindrocarpon destructans*<sup>a)</sup>

Treatment time (sec)	Mycelia	
	Maximal length ( $\mu\text{m}$ )	Mycelial fragments
0	400	Cluster
10	140	Cluster
20	120	Dispersion
30	70	"
40	70	"
50	40	"
60	30	"
90	20	"

<sup>a)</sup> Chlamydo-spores of *Cylindrocarpon destructans* (isolate CY-9801) were produced by incubating under light intensity of  $180 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$  with 12 hrs. dark and light cycle for 64 days at  $20^\circ\text{C}$  after treatment with scrapping aerial mycelia grown 10 days at  $20^\circ\text{C}$  on potato dextrose agar. Slices of the culture media were treated with ultrasonic processor (Cole-Parmer 4710, U.S.A) after homogenization using glass tissue grinder (Wheaton No. 90475, overhead stirrer, U.S.A).

상태로 존재하였다.

*C. destructans*의 균사체 절편을 초음파 처리전에 1차로 homogenization만을 실시한 경우에는 균사체 변형 후막포자들의 사슬은 세포수 1~8개로 형성된 것이 관찰되나 초음파 처리를 추가로 실시한 후에는 균사체 부위가 짧게 절단되어 1~4개의 후막포자 세포로 구성된 사슬이 관찰되었다(Table 3). 그리고 3, 4개의 후막포자 세포들로 구성된 후막포자 사슬은  $5^\circ\text{C}$ 에서 발아율이 각각 2.6%와 3.3%로 낮은 반면, 1개와 2개의 세포로 구성된 후막포자 사슬은 각각 25.4%,

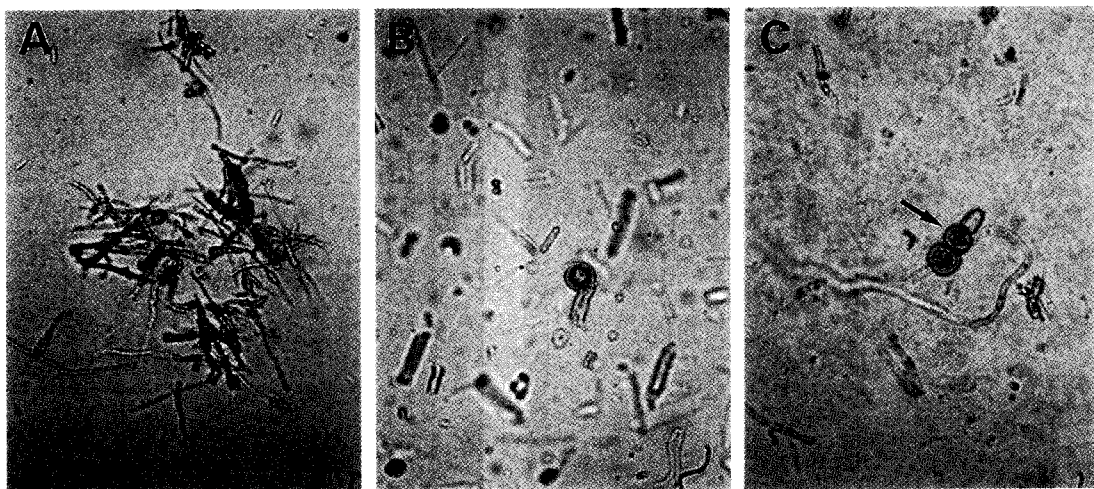
**Table 2.** Effect of ultrasonic treatment on isolation of chlamydo-spores from mycelial mat of *Cylindrocarpon destructans*<sup>a)</sup>

Treatment Time (sec)	Chlamydo-spore(%)		
	Isolated	Non-isolated	Damaged
0	$9.8 \pm 4.7$	$85.7 \pm 2.7$	$4.5 \pm 4.1$
10	$21.2 \pm 5.5$	$73.4 \pm 4.6$	$5.4 \pm 2.1$
20	$32.7 \pm 4.6$	$62.3 \pm 6.5$	$5.0 \pm 2.1$
30	$58.6 \pm 8.3$	$32.4 \pm 5.7$	$9.0 \pm 3.1$
40	$55.9 \pm 3.5$	$39.1 \pm 3.1$	$5.0 \pm 2.3$
50	$53.9 \pm 5.5$	$34.7 \pm 9.7$	$11.4 \pm 4.2$
60	$66.3 \pm 5.5$	$26.8 \pm 3.4$	$6.9 \pm 2.1$
90	$74.3 \pm 2.4$	$18.7 \pm 2.8$	$7.0 \pm 0.4$

<sup>a)</sup> Chlamydo-spores of *Cylindrocarpon destructans* (isolate CY-9801) were produced by incubating under light intensity of  $180 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$  with 12 hrs. dark and light cycle for 64 days at  $20^\circ\text{C}$  after treatment with scrapping aerial mycelia grown 10 days at  $20^\circ\text{C}$  on potato dextrose agar. Slices of the culture media were treated with ultrasonic processor (Cole-Parmer 4710, U.S.A) after homogenization using glass tissue grinder (Wheaton No. 90475, overhead stirrer, U.S.A). Values in the table were average of three replicates and standard deviation.

29.4%의 발아율로 높았다. 3, 4개의 세포로 구성된 후막포자 사슬은 낮은 발아율을 보이면서 각각 구성 세포수 전체인 3개와 4개 모두 발아되는 것은 관찰되지 않았다(Table 4).

후막포자 사슬중에서 각 구성세포의 발아율은  $20^\circ\text{C}$ 에서 2일간 배양으로 46.8% 이었으나  $5^\circ\text{C}$ , 13일간 배양할 경우 발아율은 60.7%로 측정되었다(Table 4). 이러한 발아율의 차이는  $20^\circ\text{C}$ 에서 배양할 경우 후막포자로부터 발아된 균사가 빠르게 생육되어 배양을 2일간 이상 할 경우 측정이 불가능하므로 그 이후의 발아율을 측정할 수 없으나  $5^\circ\text{C}$ 의 저온



**Plate 1.** Isolation of chlamydo-spore of *Cylindrocarpon destructans* by homogenization with glass tissue grinder and/or ultrasonic treatment. A: Clusters of mycelia and the chlamydo-spores were produced by homogenization treatment,  $\times 300$ . B: Chlamydo-spores were isolated from the mycelial mat and dispersed evenly by the additional ultrasonic treatment after the homogenization,  $\times 600$ . C: Germinated chlamydo-spore (arrow) on the potato dextrose agar which was isolated by the ultrasonic treatment,  $\times 600$ .

**Table 3.** Effect of ultrasonic treatment on split of chlamyospore catena<sup>a)</sup>

Number of cells in a catena <sup>b)</sup>	Chlamyospore (%)	
	Before treatment	After treatment
1	38.1 ± 3.8 <sup>c)</sup>	35.3 ± 5.9
2	35.4 ± 1.4	48.9 ± 6.4
3	16.2 ± 4.1	9.1 ± 4.5
4	5.3 ± 0.7	6.7 ± 4.1
5	3.3 ± 1.1	0
6	1.3 ± 0.2	0
7	0	0
8	0.4 ± 0.5	0

<sup>a)</sup> Chlamyospores of *Cylindrocarpon destructans* (isolate CY-9801) were produced by incubating under light intensity of 180  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$  with 12 hrs. dark and light cycle for 64 days at 20°C after treatment with scrapping aerial mycelia grown 10 days at 20°C on potato dextrose agar. Slices of the culture media were treated with ultrasonic processor (Cole-Parmer 4710, U.S.A) after homogenization using glass tissue grinder (Wheaton No. 90475, overhead stirrer, U.S.A).

<sup>b)</sup> The cell(s) in a catena of chlamyospores converted from mycelia in *Cylindrocarpon destructans* on potato dextrose agar.

<sup>c)</sup> The figure indicates that rate (%) of the germinated chlamyospore and values were average of three replicates and standard deviation.

**Table 4.** Germination of cell within catena of chlamyospore of *Cylindrocarpon destructans* isolated from treatment with ultrasonic process<sup>a)</sup>

Number of cell in chlamyospore catena <sup>b)</sup>	Number of germinated cells	Incubation Temperature (°C) <sup>c)</sup>	
		20	5
1	1	21.2 ± 5.1 <sup>d)</sup>	25.4 ± 6.6
2	1	14.4 ± 1.3	11.1 ± 2.0
	2	7.5 ± 2.2	18.3 ± 1.6
3	1	2.5 ± 1.0	1.3 ± 1.9
	2	0	1.3 ± 1.8
	3	0	0
4	1	1.1 ± 0.8	2.0 ± 0.0
	2	0	1.3 ± 1.9
	3	0	0
	4	0	0
total		46.8	60.7

<sup>a)</sup> Chlamyospores of *Cylindrocarpon destructans* (isolate CY-9801) were produced by incubating under light intensity of 180  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$  with 12 hrs. dark and light cycle for 64 days at 20°C after treatment with scrapping aerial mycelia grown 10 days at 20°C on potato dextrose agar. Slices of the culture media were treated with ultrasonic processor (Cole-Parmer 4710, U.S.A) after homogenization using glass tissue grinder (Wheaton No. 90475, overhead stirrer, U.S.A).

<sup>b)</sup> The cell(s) in a catena of chlamyospores converted from mycelia in *Cylindrocarpon destructans* on potato dextrose agar.

<sup>c)</sup> The chlamyospores were incubated for 2 days at 20°C or 13 days at 5°C.

<sup>d)</sup> The figure indicates that rate (%) of the germinated chlamyospores and values were average of three replicates and standard deviation.

**Table 5.** Germination of a cell or a catena of chlamyospore isolated from ultrasonic treatment of mycelia of *Cylindrocarpon destructans*<sup>a)</sup>

Culture media	Germination (%) of chlamyospore in a form of <sup>b)</sup>	
	Cell	Catena
Potato Dextrose Agar	55.8 ± 1.1	73.4 ± 5.3
Czapek solution Agar	48.8 ± 2.6	74.0 ± 6.1

<sup>a)</sup> Chlamyospores of *Cylindrocarpon destructans* (isolate CY-9801) were produced by incubating under light intensity of 180  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$  with 12 hrs. dark and light cycle for 64 days at 20°C after treatment with scrapping aerial mycelia grown 10 days at 20°C on potato dextrose agar. Slices of the culture media were treated with ultrasonic processor (Cole-Parmer 4710, U.S.A) after homogenization using glass tissue grinder (Wheaton No. 90475, overhead stirrer, U.S.A).

<sup>b)</sup> Germination rate of the cell is the ratio of germinated chlamyospore cells to the total chlamyospore cells to the total chlamyospores isolated. Germination rate of the catena was calculated as the ratio of number of the catena with germinated chlamyospore(s) to the total catenae.

배양에서는 발아된 균사의 생육이 완만하여 오랜 배양기간을 통해 충분히 후막포자의 발아를 유도하면서 측정을 할 수 있었기 때문에 보다 높은 발아율 측정이 가능하였던 것으로 판단된다. 이러한 온도별 발아특성은 유등<sup>9)</sup>이 *C. destructans*의 액체배양을 통해 생성 및 분리한 후막포자에 대해 온도별로 역시 액체배양을 한 결과 20°C에서 발아가 관찰되지 않았다는 결과와는 상이하였다. 그러나 본 실험은 고체배지에서 배양하여 얻은 결과이므로 이러한 배양조건의 차이가 다른 결과로 나타났던 것으로 판단된다. 앞으로 배양온도 범위를 넓게하여 실험하여야 보다 정확한 온도별 발아특성 구명이 이루어 질 것으로 생각된다.

근부병균 균사체를 초음파처리하여 분리된 후막포자는 1~4 개의 세포로 구성된 시슬형태이므로 후막포자의 발아율 측정에 총 후막포자갯수에 대한 발아된 후막포자의 비율로 조사할 경우 발아율은 48.8~55.8% 이었으나 각 후막포자 시슬 균을 하나의 집단으로 보아 발아율을 측정할 경우에는 73.4~74.0%의 비율로 측정되었다(Table 5).

위와같이 초음파처리에 의해 *C. destructans*의 후막포자를 분리하고 각 배지에서 후막포자의 발아특성 시험을 실시함으로써 앞으로 후막포자의 생리적 특성을 확실하고 쉽게 연구하게 되었다. 또한 이 병원균의 방제와 관련된 연구를 비롯해서 토양내의 병원균 밀도측정을 위한 선택배지 혹은 bioassay 등에 본 연구의 방법이 이용될 것으로 생각된다.

## 요 약

인삼 뿌리썩음병균 *Cylindrocarpon destructans* 균사체를

homogenization 단독 처리로 분쇄할 경우 균사체 절편길이는 약 400  $\mu\text{m}$ 이고 용액내에 복잡하게 뭉쳐있으며 후막포자의 순수분리율은 9.8%로 측정되었다. 그러나 homogenization으로 전처리 한후 초음파 처리를 부가하여 실시한 결과, 처리 시간 20초 경과부터 분쇄된 균사체는 용액내에 고루 분포되었고 90초간 초음파 처리후에는 균사체 길이가 20  $\mu\text{m}$  정도로 되었으며 전체 후막포자중 74.3%의 후막포자가 균사체로부터 분리되었다.

*C. destructans* 균사체의 homogenization 단독처리시 후막포자들의 사슬은 세포수 1~8개로 형성된 것이 관찰되나 초음파를 부가로 처리한 결과 1~4개의 후막포자 세포로 구성된 사슬만이 관찰되었다.

초음파 처리로서 분리된 후막포자 사슬중에서 각 구성세포의 발아율은 potato dextrose agar(PDA)에서 20°C, 2일간 배양한 결과 46.8%로 측정되었으며 5°C에서 13일간으로 장기간 배양한 결과 발아율은 60.7%로 측정되었다.

*C. destructans* 균사체를 초음파처리하여 분리된 후막포자는 20°C, PDA배지 배양조건에서 총 후막포자 세포수에 대해 발아한 후막포자 세포의 발아율은 55.8% 이며 총 후막포자 사슬군(catenae)에 대해서 발아한 각 후막포자 사슬군의 발아율은 73.4%의 비율로 측정되었다.

### 감사의 말씀

본 연구는 1999년도 한국담배인삼공사 출연금에 의해 실

시되었으며 이에 감사드립니다.

### 인용문헌

1. Chung H. S. : *Rept. Tottori Mycol. Inst. (Japan)*, **12**, 127 (1975).
2. 오승환, 유연현, 김기황, 조대휘 : 인삼연구보고서(재배분야), 한국인삼연초연구원 p.123-158 (1992).
3. 조대휘, 박규진, 유연현, 오승환, 이호자 : *고려인삼학회지* **19**(2), 177 (1995).
4. 조대휘, 유연현, 오승환, 이호자 : *고려인삼학회지*. **20**(1), 94 (1996).
5. 조대휘, 유연현, 오승환, 이호자 : *한국식물병리학회지*. **13**(1), 34 (1997).
6. 조대휘, 유연현, 오승환, Jennifer L. Park : *고려인삼학회지*, **22**(4), 307 (1998).
7. 조대휘, 유연현, 오승환 : *고려인삼학회지*. **23**(3) 129 (1999).
8. French E. R. and Nielson, L. W. : *Phytopathology* **56**, 1322 (1966).
9. Short G. E. and Lacy, M. L. : *Phytopathology* **64**, 558 (1974) 9.
10. Darmono, T. W., and Parke, J. L. : *J. Bot* **68**, 640 (1990).
11. 유성준, 조진웅, 조재성, 유승현 : *한국식물병리학회지*. **12**(4) 422 (1996).
12. Dhingra, O. D., and Sinclair, J. B. : *Basic plant pathology method 2nd ed.*, CRC Press Inc., Florida 227 (1995).