

두릅나무 묘목생산포의 역병 발생 및 분리균의 균학적 특성

이상현* · 이재필 · 김경희 · 신현동¹

국립산림과학원 산림병해충과, ¹고려대학교 환경생태공학부

Root Rot of Japanese Angelica Caused by *Phytophthora cactorum* in Nursery and Mycological Characteristics of the Isolates

Sang-Hyun Lee*, Jae Pil Lee, Kyung-Hee Kim and Hyeon-Dong Shin¹

Department of Forest Diseases and Insect Pests, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-012, Korea
¹Division of Environmental Science and Ecological Engineering, College of Life and Environmental Sciences, Korea University, Seoul 136-701, Korea

(Received December 14, 2005)

ABSTRACT: In 2003 to 2005, the root rot of Japanese angelica (*Aralia elata*) was surveyed in nursery beds of Korea, where incidence of the disease often reached up to 100%. Three isolates were obtained from the infected roots, and identified as *Phytophthora cactorum* on the basis of cultural, morphological characteristics and molecular analysis. The isolates were characterized by having markedly papillate and broadly ovoid deciduous sporangia. The optimum temperature for mycelium growth was at 25°C on V8 juice agar. Pathogenicity of the isolates was confirmed by soil mixture inoculation. Approximately 900 bp of ITS rDNA was amplified from all 3 isolates and band pattern of restriction fragments observed by *Alu* I, *Msp* I, and *Taq* I digestion also supported the result of the morphological identification when compared with PhytID database.

KEYWORDS: *Aralia elata*, Pathogenicity, *Phytophthora cactorum*, Root rot, Shoot blight

두릅나무 [*Aralia elata* (Miq.) Seem.]는 두릅나무과 (Araliaceae)에 속하는 낙엽활엽수로 전국의 산야에 자생한다. 어린순은 맛과 향이 독특하여 나물, 찜, 튀김 등의 식용으로 많이 쓰이며, 일본과 중국에서도 애용되고 있는 대표적인 봄철 고급산채이다. 우리나라에서는 오랜 동안 자생하는 두릅나무에서 두릅순을 채취하여 자가이용하거나 소량 판매되었다. 최근에 두릅순의 수요가 증가하면서 대량생산을 위한 새로운 재배법이 개발되었다. 즉, 포장에서의 상업재배를 위한 두릅나무 묘목의 공급을 위하여 늦가을이나 초봄에 흙근을 분리하여 번식시키는 대량번식법이 개발되었다(문 등, 2004).

이와 같은 재배법은 필연적으로 병해의 발생을 증가시켰고, 결과적으로 병해로 인한 경제적 피해도 증가하고 있다. 지금까지 우리나라에서 기록된 두릅나무의 병은 9가지가 있으나(한국식물병리학회, 2004), *P. cactorum*에 의한 역병, *E. araliae*에 의한 더벙이병, *P. araliae*에 의한 뒷면모무늬병이 많이 발생하고 있으며 상당한 경제적 피해를 일으키고 있다(문 등, 2005; 이상현 등, 미발표자료). 그 중 역병은 지 등(2000)에 의해 처음 보고되었는데, 병원균을 *P. cactorum*으로 동정하였다. 그들은 두릅나무 역

병의 발병상황이 심하며, 경남·강원·충북 등지의 거의 모든 두릅나무 재배농가 포장에서 발생하며, 뿌리와 지표부위 줄기가 썩고 포기는 시들어 말라 죽는다고 기록하였다. 한편, 일본에서도 *P. cactorum*에 의한 두릅나무 역병이 보고되었는데(Uchida et al., 1984a, b), 병원균의 형태적 특징 및 생리적 특성을 기록하였다.

따라서 본 연구는 두릅나무 묘목생산포에서의 역병 발생상황에 대한 조사, 분리한 병원균의 형태적 및 배양적 특징 조사, 분자생물학적 기법인 rDNA의 ITS 영역의 PCR 증폭 및 RFLP 분석 등을 수행하였다.

병발생 조사

2003년 6월부터 2005년 10월까지 11개 지역의 두릅나무 묘목생산단지를 답사하여 역병의 발생상황을 조사하였다. 각 단지에서 역병의 전형적인 병징인 뿌리썩음, 지상부 마름 및 위축 증상을 나타내는 두릅나무를 20~50본씩 굴취하여 병환부의 조직을 현미경으로 검사하였다. 묘목생산단지의 발병상황은 달관조사의 결과로 표시하였다. 그 결과, 11개 지역 중 10개 지역에서 발생이 확인되었으며 때로는 극심한 피해를 주고 있었다(Fig. 1A). 온실에 식재한 2곳(경주, 진주)에서는 발병이 미미하였으나, 노지에 식재한 경우에는 대체로 발병이 심하였다.

*Corresponding author <E-mail: shlee4@foa.go.kr>

Table 1. Incidence of *Phytophthora* root rot in Japanese angelica in several nursery beds

Location	Area (m ²)	Nursery type	Date surveyed	Disease incidence*
Gapycong	2,200	field	Sep. 2003	-
Chuncheon	5,000	field	Jun. 2003	+++
			Oct. 2003	++++
Gyeongju	2,535	field	Oct. 2005	+-
Gyeongju	No data	glass-house	Oct. 2003	+
Jinju	2,000	field	Oct. 2003	+++
			Sep. 2005	++++
Jinju	No data	plastic house	Oct. 2003	+
Jeju	7,000	field	Jun. 2004	++++
Gongju	5,900	field	Sep. 2003	++++
Wando	3,500	field	Sep. 2003	++++
Naju	9,480	field	Oct. 2005	++
Jeonju	7,000	field	Sep. 2003	+++

*- : No infected tree found.
 + : Less than 10% of tree infected.
 ++ : 10~25% of tree infected.
 +++ : 25~50% of tree infected.
 ++++ : More than 50% of tree infected.

춘천에 위치한 노지포장의 경우에는 1년차 식재지에서 는 발병주를 발견할 수 없었으나, 2년차 식재지에서는 6 월에 50%에 가까운 발병률을 나타냈고 10월에는 진전한 개체를 찾기 어려울 정도로 진전되어 거의 모든 두릅나무 가 고사하였다. 또한 약 7,000 m²의 면적에 약 50,000본 을 식재한 제주의 노지포장에서는 2003년에 역병이 대발 생하여 2004년 6월에 답사하였을 때는 대부분의 두릅나 무를 굴취·제거하여 약 500 m²의 면적밖에 남지 않았다. 또한 노지포장에 식재한 경주, 진주, 공주, 원도, 나주, 전주에서는 모두 약 25% 이상의 발병률을 나타내었다 (Table 1).

이러한 발병상황으로 볼 때, 두릅나무 역병은 묘목생산 에서는 매우 심각한 문제를 일으키는 것으로 판단된다. 본 연구기간 동안 생산포장에서는 구체적인 조사를 수행하지 않았지만, 몇몇 생산포장에서 관찰한 길주의 대부분은 병 든 묘목의 식재로 인한 것으로 사료되며 시들음 증상을 나 타낸 그루의 지표부위에서 전형적인 역병의 병징을 관찰 할 수 있었다. 따라서 두릅나무 역병은 묘목생산단지뿐만 아니라 생산포장에서도 널리 발생하고 있으며, 정확한 발 병조사 및 종합적인 방제대책이 절실히 요구된다.

균주 분리, 동정 및 병원성 확인

병징을 나타내는 식물조직과 뿌리를 증류수로 세척하고, 멸균된 흡습지로 여분의 수분을 제거한 후에 약 1 mm 의 조각으로 잘라서 PDA 배지(Potato dextrose agar)와 PARPH 배지(Corn meal agar를 기본배지로 하고, 기본 배지 1리터 당 pimarcin 10 mg, ampicillin 100 mg, rifampicin 10 mg, PCNB 100 mg, Hymexazole 25 mg 첨 가) 위에 각각 올려놓았다. 각 페트리접시는 암조건상태 의 20~22°C 항온기에 두고 2~5일간 관찰하면서 치상한

조직으로부터 자라나온 균총을 분리하였다. 분리된 균주 는 V8주스배지에 이식하여 5일간 배양하면서 이상유무를 확인하였다. 그 후 지 등(2000)의 방법에 따라 10% V8주 스 사면배지에 이식하여 7일간 배양하였으며, 충분히 생 장한 균주는 광유를 부어서 15°C의 항온기에 보존하였다.

본 연구를 통하여 진주에서 J1, 춘천에서 K4와 K6 등 3균주를 분리하였다. 형태적 특징은 V8주스배지에서 배양 한 J1 균주를 대상으로 광학현미경과 Optimas 6.5 program 을 사용하여 관찰하였다. 유주포자낭과 유성생식 기관은 배양 5일째와 10일째에 한 번씩 관찰하였으며, 유주포자 낭 등의 형태적 특징은 50개씩 측정하였다.

유주포자낭은 좌우대칭형 유주포자낭경의 짧은(1.2~5.1 μm) 자루에 단생하며, 뚜렷한 돌출형이고, 크기는 24.1~ 32.3×24.8~37.8 μm(길이/폭 = 1.2~1.45)이며, 타원형 내 지 구형이고, 유주포자의 출구는 5~7 μm로 좁은 편이었 다(Fig. 1B). 후벽포지는 드물게 형성되었으나 구형이며, 크기는 24.6~33.3×25.0~34.3 μm(평균 28.6×29.4 μm)이 고, 벽의 두께는 1~1.5 μm였다. 유성생식기관은 고체배지 와 액체배지에서 모두 형성되었다. 장정기는 측착형이며, 크기는 10~12 μm로 구형 내지 골프클럽형이며, 균사의 끝에 형성되었다. 장난기는 개끈한 벽을 가진 구형으로 시름은 22~32 μm(평균 28 μm)이었다. 난포자는 총만형 과 비총만형이 모두 관찰되었지만 대부분 총만형이었고, 크기는 20~28 μm(평균 25 μm)이며 벽의 두께는 약 2 μm 였다(Fig. 1C). 한국에서 분리한 J1 균주의 유주포자낭의 크기는 Erwin and Ribeiro(1996)이 기록한 *Phytophthora cactorum*의 유주포자낭의 크기(30~37×25~27 μm)와 장 폭비(1.17±0.19)와 거의 비슷하였으며, Oudemans and Coffey(1991)이 제시한 크기(31.4±4.8×26.4±4.0 μm) 및 장폭비(1.2±0.1)와도 차이가 없었다. 기타 다른 배양

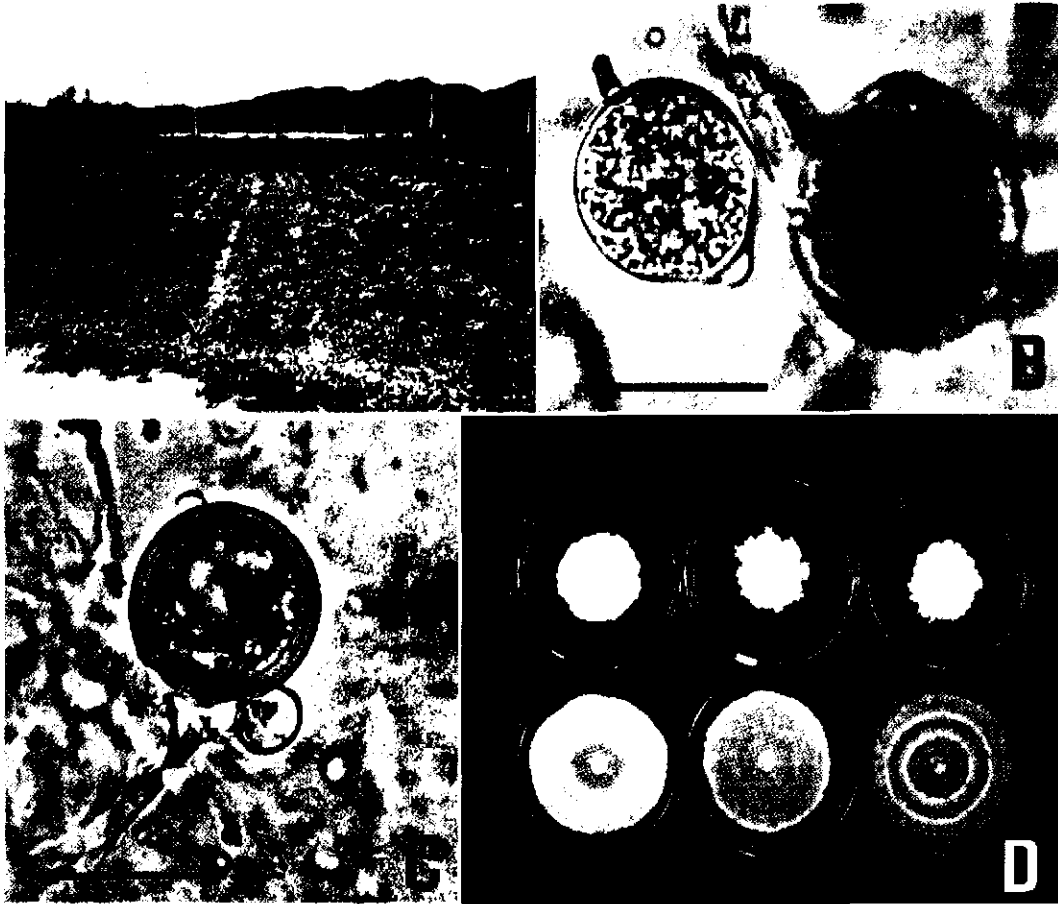


Fig. 1. A heavily infected field and mycological characteristics of the pathogen *Phytophthora cactorum*. A, A nursery bed of Japanese angelica heavily infected with *P. cactorum*; B, Sporangium (left) and Chlamydospore (right); C, Oogonium and antheridium; D, Mycelial growth on PDA (upper line) and V8 juice agar (lower line) of J1, K4, and K6 isolates from the left. Scale bar = 30 μ m.

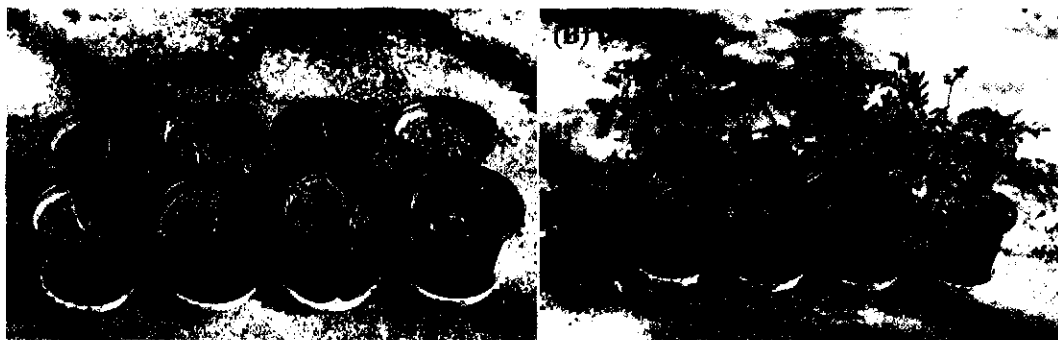


Fig. 2. Pathogenicity of *Phytophthora cactorum* J1 isolate on Japanese angelica by soil mix inoculation. The seedlings of the inoculated pots (A) were severely wilted at 30 days after inoculation, while those of the uninoculated pots (B) are healthy.

적 및 형태적 특징도 *P. cactorum*을 기록한 기존의 기록과 일치하였다(Waterhouse and Waterston, 1996; 지 등, 1997; 류 등, 1998; 임 등, 1998). 이와 같은 특징으로 볼 때, 이 균을 *P. cactorum*(Lebert & Cohn) J. Schrt.으로 동정하였다.

한편, 약 6개월 동안 자란 건강한 두릅나무 분근유묘 30본의 화분(직경 30 cm)에 접종하였다. 즉, V8주스배지

에 충분히 배양시킨 J1 균주를 살균토양과 50 : 50(v/v)으로 섞어서 화분의 토양 위에 살포하고 그 위에 살균토양을 얇게 덮었다. 그 후 20~25°C의 온실에서 관리하면서 하루에 두 번씩 관수하여 발병을 유도하였으며, 접종 5일 후부터 매일 조사하였다. 한편, 동일한 환경에 균주를 접종하지 않은 분근유묘 9본을 대조구로 설정하였다.

P. cactorum J1 균주를 접종한 두릅나무 유묘에서 접종

후 9일째에 지상부에 시들음 증상이 나타나기 시작했으며, 감염된 나무는 일반적으로 15~30일 사이에 지상부의 경엽이 고사하였다(Fig. 2). 이러한 고사주는 지표부위에 수침상의 병반과 뿌리썩음 증상이 뚜렷이 나타났으며, 병환부의 조직으로부터 동일한 균이 분리되었다. 따라서 분리된 *P. cactorum* 균주는 두릅나무를 성공적으로 재감염시켰으므로 병원성이 확인되었다.

배양적 및 분자생물학적 특징

배양적 특징은 J1 균주를 기준으로 기록하였으며, 분자생물학적 특징의 연구에는 3균주를 모두 사용하였다. 분리된 균주는 성장속도 등의 배양적 특징과 유주포자낭, 장난기, 장정기, 후벽포자 및 균사의 형태적 특징에 기초하여 동정하였다. 또한 이 균의 ITS rDNA의 증폭에 이은 RFLP 분석을 통한 밴드양상을 PhyID의 데이터베이스에서 비교하였다.

배양적 특징. 분리균주 3가지를 25°C의 암조건으로 PDA와 V8주스배지에서 각각 10일간 배양하여 볼로니의 형태를 관찰하였다. 균사생장 및 최적생장온도를 비교하는 실험에서는 분리균주 J1을 V8주스배지에서 5일간 배양하고 균총의 끝부분에서 지름 7 mm의 플러그를 떼어내어 제곱종하는 방법으로 각각 3반복 수행하였다. 서로 다른 배지에서의 균사생장을 비교하기 위하여 PDA, V8주스배지, Malt agar, Oat meal agar, Sabouraud dextrose agar, Lima bean agar, Cornmeal agar, Czapek dox agar 등 8가지의 평판배지(직경 9 cm, 15 ml media/plate) 중양에 치상하였으며, 25°C에서 배양하며 7일간의 균사생장량을 균총의 직경으로 측정하였다. 한편, 균사생장 저온은 PDA와 V8주스배지에서 암조건으로 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35°C에서 배양하고 7일째에 균총의 지름을 측정하였다.

V8주스배지에서 균총은 솜털 같은 기증균사로 덮였으며, PDA 배지에서는 기증균사가 중앙에만 밀집되어 있었다(Fig. 1D). J1과 K4 균주는 비슷한 성장속도를 보였으나, K6 균주는 PDA 배지에서 상대적으로 훨씬 자랐다. J1 균주에서 최적생장을 위한 배지는 OA, V8, LBA, CMA, MA, PDA, CDA 그리고 SDA의 순서였다(Fig. 3).

생장의 최적 온도는 25°C였으며, 5°C와 30°C에서는 생장이 미약하였으나 생존에는 영향을 끼치지 않았다. 임 등(1998)은 복숭아 과일역병의 원인균인 *P. cactorum* 역시 7°C 이하 또는 32°C 이상의 온도에서는 성장하지 않았다고 기록하였으며, 류 등(1998)은 백합에서 분리한 *P. cactorum*이 6°C 이하 또는 34°C 이상에서의 온도에서는 생장을 멈추었다고 보고하였다. 본 연구에서 분리된 세 균주의 최적생장온도는 25°C로서, 기존의 문헌과 일치하였다. 모든 배양적 특징은 *P. cactorum*에 대한 기존의 문헌에서의 기록과 일치했다.

분자생물학적 특징. V8주스배지에서 배양한 3 균주를 Cooke and Duncan(1997)의 방법으로 실시하였다. ITS4

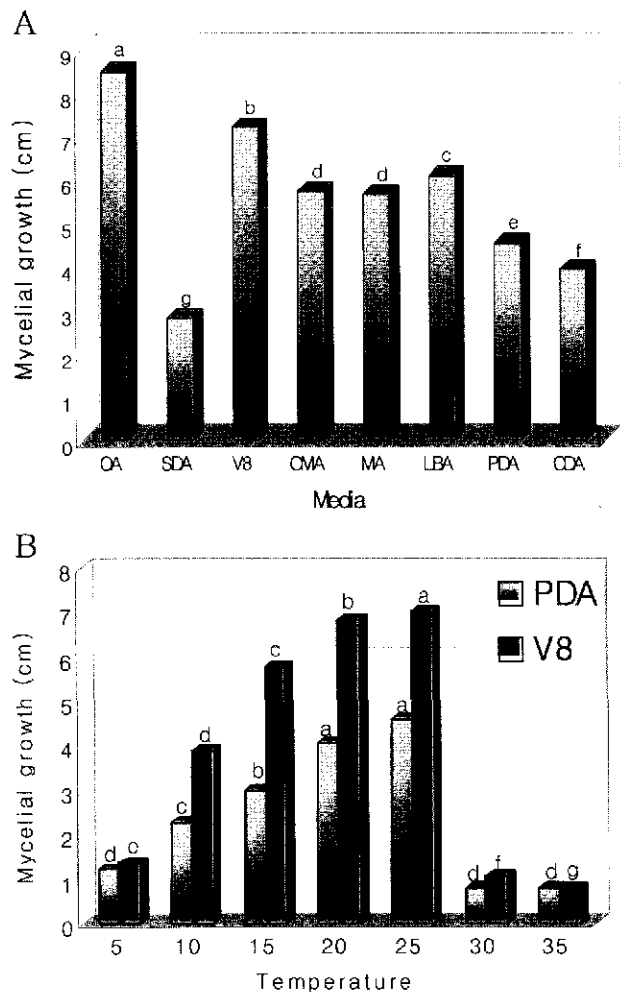


Fig. 3. Mycelial growth of J1 isolate of *Phytophthora cactorum* on different media and temperature. **A**, The fungus was incubated at 25°C for 7 days on oat meal agar (OA), Sabouraud dextrose agar (SDA), V8 juice agar (V8), cornmeal agar (CMA), malt extract agar (MA), Lima bean agar (LBA), potato dextrose agar (PDA) and Czapek dox agar (CDA); **B**, Mycelial growth of J1 isolate was checked at 7 days' incubation on PDA and V8 under different temperature. Values followed by the same letter are not significantly different at the 5% level according to Duncan's test.

와 ITS6 primer를 이용하여 rDNA의 ITS 영역을 증폭했을 때, J1, K4, K6 균주 모두에서 약 900 bp의 증폭산물이 생성되었다. *Alu* I 제한효소를 처리했을 경우에는 4개의 밴드, 즉 7, 170, 190, 530 bp 길이의 밴드를 형성했으며(Fig. 4), *Msp* I와 *Taq* I 제한효소를 처리했을 경우에는, 각각 110, 180, 220, 390 bp의 4개의 밴드와 7, 60, 90, 100, 150, 200, 300 bp의 7개의 밴드를 형성하였다(data not shown). PhyID 데이터베이스에서 위의 3가지 제한효소에 의한 결과를 분석해본 결과, 3균주는 *Alu* I에 의한 밴드양상만 약간 상이할 뿐 데이터베이스의 *P. cactorum* *alu* alternative와 일치하였다. *P. cactorum* *alu* alternative은

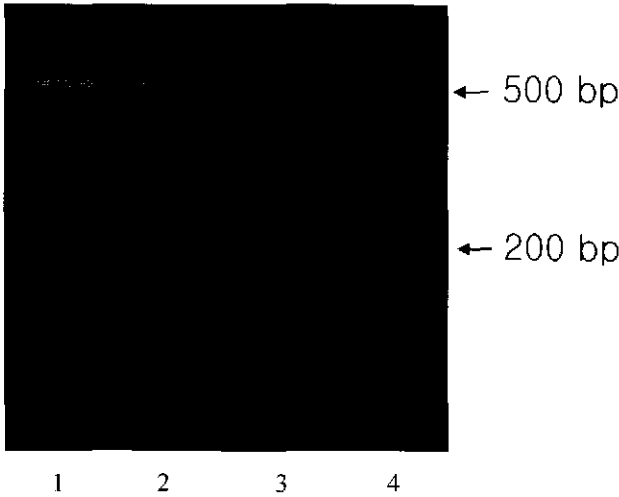


Fig. 4. *Alu I* Restriction enzyme digestions of PCR products amplified from 3 isolates of *Phytophthora cactorum* with primer pairs ITS4/ITS6. 1, J1; 2, K4; 3, K6; 4, DNA ladder marker (100 bp).

*P. cactorum*와는 배양적인 그리고 형태적인 특징은 동일하나 위 분석에 의한 밴드양상이 상이해서 현재 분자적인 수준에서 구분되어 있는 상태이다. 하지만, 현재 이 둘을 종 수준에서 구분할 수 있는 특징이 발견되지 않았으므로, *P. cactorum*으로 동정할 수밖에 없다. *P. cactorum*와 *P. cactorum* alu alternative 사이를 구분하기 위한 형태적인 또는 배양적인 특징이나 다른 유전자나 분석방법 등의 추가적인 연구가 필요하다.

적 요

2003년부터 2005년 사이에 한국의 두릅나무에 심각한 역병이 발생하였다. 감염된 두릅나무와 토양으로부터 병원균이 분리되었으며, 이 균은 배양적인 그리고 형태적인 특징 및 병원성 검증 실험에 의해 *P. cactorum*(Lebert & Cohn) J. Schrt.으로 동정되었다. 이 균은 뚜렷한 돌출형이고, 둥근 난형모양의 탈락성 유주포자낭의 특징으로 다

른 역병균으로부터 형태적으로 구분되었다. 최적의 생장 온도는 V8 배지와 Oat meal 배지에서 25°C이었다. PCR을 통해 ITS rDNA 영역의 약 900 bp의 길이가 증폭되었으며, 세 가지 효소인 *Alu I*, *Msp I*, *Taq I*을 이용한 PCR-RFLP 분석 결과를 *PhyID*의 데이터베이스에서 분석한 결과 형태적인 그리고 배양적인 특징에 의한 결과와 일치했다.

참고문헌

류경열, 김령희, 이영희, 허노열. 1998. *Phytophthora cactorum*에 의한 백합 역병. 한국식물병리학회지 **15**(5): 458-462.
 분홍규, 김세현, 손석규, 이정호, 정현관. 2004. 두릅나무 및 음나무 재배기술. 국립산림과학원 연구자료 제228호.
 _____, 이상현, 김용욱, 박소영, 김경희. 2005. 두릅나무 재배, 생산 및 병해방제 기술. 산림과학속보 05-04. 국립산림과학원.
 임양숙, 정기채, 지형진, 김진수, 여수갑. 1998. *Phytophthora cactorum*에 의한 복숭아 과일역병. 한국식물병리학회지 **14**(1): 99-101.
 지형진, 조원대, 김충희. 2000. 한국의 식물역병. 농업과학기술원, 농촌진흥청. 226 pp.
 한국식물병리학회. 2004. 한국식물병명명록 4판. 779 pp.
 Cooke, D. E. L. and Duncan, J. M. 1997. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on the ITS1 and ITS2 sequences of ribosomal DNA. *Mycol. Res.* **101**: 667-677.
 Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St. Paul, Minnesota. 562 pp.
 Oudemans, P. and Coffey, M. D. 1991. A revised systematics of twelve papillate *Phytophthora* species based on isozyme analysis. *Mycol. Res.* **95**: 1025-1046.
 Uchida, T., Akaike, Y., Asari, S. and Miyata, Y. 1984a. Studies on ecology and control of *Phytophthora* root rot of angelica tree (1). Occurrence of the new disease and its symptoms. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **50**: 392. (abst.)
 _____, _____, _____ and _____. 1984b. Studies on ecology and control of *Phytophthora* root rot of angelica tree (2). Morphology and physiological properties of the pathogen. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **50**: 393. (abst.)
 Waterhouse, G. M. and Waterston, J. M. 1966. *Phytophthora cactorum*. *Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 111*. Wallingford, UK: CAB International.