



## 밤나무 근권토양에서 분리한 *Ilyonectria radiculicola* 균주의 인삼에 대한 병원성 및 유전적 분석

서문원\*\*\* · 송정영\* · 김선익\*\*\* · 오상근\* · 김흥기\*†

\*충남대학교 응용생물학과, \*\*농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, \*\*\*충청남도농업기술원 인삼약초연구소

### Pathogenicity on Ginseng and Sequence Assays of *Ilyonectria radiculicola* Isolated from Chestnut Rhizosphere Soils

Mun Won Seo\*\*\*, Jeong Young Song\*, Sun Ick Kim\*\*\*, Sang Keun Oh\* and Hong Gi Kim\*†

\*Department of Applied Biology, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea.

\*\*Department of Herbal Crop Research, NIHHS, Eumseong 27709, Korea.

\*\*\*Ginseng and Medicinal Crop Experiment Station, CNARES, Geumsan 32713, Korea.

#### ABSTRACT

**Background:** A soil-borne pathogenic fungus, *Ilyonectria radiculicola* (*Cylindrocarpon destructans*) causes root rot on ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) and is known to attack many other plants. The *Nectria/Neonectria radiculicola* complex has been renamed as the *I. radiculicola* complex after analysis of its multi-gene relatedness and morphological characteristics. The fungi in this complex have been reclassified into 16 species under the genus *Ilyonectria* based on characteristics analysis

**Methods and Results:** To obtain useful data from the Korean ginseng root rot, *I. radiculicola* was isolated from the rhizosphere soils of the chestnut tree. They were identified through a pathogenicity test and a survey of the morphological features. The existence of *I. radiculicola* in soil samples was confirmed by PCR detections using nested PCR with species-specific primer sets. These were subsequently isolated on semi-selective media from PCR-positive soils. Genetic analysis of the *I. radiculicola* complex containing these pathogens was done by comparing the DNA sequences of the histone h3 region. These isolates originating from the rhizosphere soils of chestnut constituted a clade with other closely related species or *I. radiculicola* isolates originating from ginseng or other host plants, respectively. Additionally, the pathogenicity tests to analyze the characteristics of these *I. radiculicola* isolates revealed that they caused weakly virulent root rot on ginseng.

**Conclusions:** This is the first study reporting that *I. radiculicola* isolates from chestnut rhizosphere soils can attack ginseng plant in Korea. Thus, these results are expected to provide informations in the selection of suitable fields for ginseng cultivation.

**Key Words:** *Ilyonectria radiculicola*, *Panax ginseng* C. A. Meyer, Chestnut Rhizosphere Soils, Ginseng Root Rot, Weakly Virulence

#### 서 언

음지성의 약용작물인 인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer) 은 4-6년간 동일 포장 내에서 장기간 재배로 인해 뿌리썩음 병을 비롯한 각종 병해에 의한 피해가 크기 때문에 재배자들은 초작지에서의 인삼재배를 선호한다 (Cho *et al.*, 1995).

국내 대표적 약용작물인 인삼의 최대 생산 저해요인은 뿌리

썩음병으로 알려져 있는데, 그 중 토양전염성균인 *Ilyonectria radiculicola* (*Cylindrocarpon destructans*)는 재배 후에도 10년 이상 토양 내에 존재하여 연작장해를 일으키는 것으로 알려져 있으며 (Kang *et al.*, 2007), 이들 병원균의 방제를 위해 윤작을 이용한 인삼뿌리썩음병 억제에 많은 연구가 이루어지고 있다 (Lee *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017).

†Corresponding author: (Phone) +82-42-821-5768 (E-mail) hgkim@cnu.ac.kr

Received 2018 April 24 / 1st Revised 2018 June 4 / 2nd Revised 2018 July 4 / 3rd Revised 2018 July 18 / Accepted 2018 July 23

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

인삼 뿌리썩음병균인 *C. destructans*는 참나무, 차나무, 삼나무, 호두나무, 감자, 당근 등이 기주로 알려져 있으며 (Booth, 1966; Matuo and Miyazawa, 1984), 식물 및 수목의 근권과 근면에도 부생적으로 흔하게 존재하는 균으로 알려져 있고 (Singleton *et al.*, 1992; Punja, 1997; Reeleder *et al.*, 2002), 국내에서는 인삼, 작약, 딸기에서 발생이 보고되어 있다 (KSPP, 2009).

국내의 경우, 작약에서 분리된 *C. destructans*는 검은뿌리썩음병을 일으켜 인삼과 마찬가지로 작약에 연작장해를 일으키기 쉽고 (Choi *et al.*, 2004), 인삼에 대하여 뿌리썩음병을 일으키는 것으로 밝혀졌으며, 새로운 분류체계에 의하여 *I. robusta*로 재분류되었다 (Seo *et al.*, 2017).

Jun (2008)은 밤나무 뿌리의 썩은 부위와 주변 토양에서 *C. destructans*를 검출하였고, 밤나무 포장에서 인삼 포장으로 개간한 토양에서 높은 빈도로 *C. destructans*를 검출하였다. 그러나 밤나무 뿌리의 썩은 부위나 주변 토양에서 분리된 *C. destructans*의 병원성 검정이나 새로운 분류체계에 따른 종의 분류는 이루어지지 않았다.

최근 형태학적 분석과 multi-locus를 활용한 유전적 특성을 비교하여 *C. destructans* 그룹을 *I. radiculicola* 그룹으로 재분류하였고 이들을 다시 총 16 개의 종으로 나누었다. 또한 인삼으로부터 분리된 종으로는 *I. mors-panacis*, *I. robusta*, *I. panacis*, *I. crassa* 등 모두 4 종이 분류되었다 (Cabral *et al.*, 2012).

본 연구는 밤나무 근권토양에서 분리한 *C. destructans*를 재분류하고, 이들 분리균의 병원성 검정을 통해 인삼에 대한 발병여부를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 토양 수집 및 균주 분리

밤나무 근권토양으로부터 균을 분리하기 위하여 충남 공주 5 개 지역의 밤나무 포장에서 각각 20 개씩, 총 100 개의 토양시료를 채집하였다. 이들을 nested PCR (first round; ITS 1, 4 primer set, second round; dest 1, 4 primer set) 방법을 이용한 PCR 분석으로 토양 내 인삼뿌리썩음병균 (*C. destructans*)의 존재를 확인하였다.

PCR 검출을 통해 병원균의 존재가 확인된 토양으로부터 균주를 분리하기 위하여 토양 시료 1,000 배 희석액 100  $\mu$ l를 반선택배지 [czapek solution agar 49 g, pentachloronitrobenzene (PCNB) 0.5 g, difenoconazol 2 mg, chloramphenicol 0.2 g, azoxystrobin 1 mg]에 도말을 하였고, 압조건하에서 15°C, 21 일간 보관하였다. 그 후 배지에 유도된 colony 중 형태학적으로 인삼뿌리썩음병균과 유사한 균사를 potato dextrose agar (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA)에 각각 단균사

를 떼어 재분리하였으며, 추후 정확한 종 동정을 위해 DNA를 분리하여 histone h3 영역의 염기서열 분석에 사용하였다.

### 2. 병원성 검정

밤나무 근권토양에서 분리된 *I. radiculicola* 균주는 인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)에 대한 병원성 유무 및 그 차이를 알아보기 위하여 묘삼을 이용하여 병원성 검정을 실시하였다.

PDA 배지에 분리된 *I. radiculicola* 균주를 14 일간 20°C에서 배양하였으며, 배양된 균사는 40 ml의 멸균수를 넣고 마쇄하여 현탁액을 만든 다음, 묘삼을 배양현탁액에 침지시킨 후 예정지 관리를 한 충남 금산에 위치한 인삼약초연구소에서 묘삼을 이식하고 그 병원성 정도를 확인하였다.

또한 인삼에서 분리된 *I. mors-panacis* CY8005 균주와 *I. cyclaminicola* CY8073 균주를 대조균주로 사용하여 병원성의 차이를 확인하였다.

### 3. DNA 분리 및 염기서열을 이용한 유연관계 분석

밤나무 근권토양에서 얻은 *C. destructans* 균주들의 genomic DNA 분리를 위해 PDA 배지에 분주하여 20°C, 압 조건에서 정치 배양하였다.

균사를 수확하여 동결건조시켜 마쇄한 후, proteinase K (50  $\mu$ l)와 extraction buffer [200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% SDS]를 넣고, 2  $\times$  CTAB solution [2% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% PVP, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA]를 첨가하였다. 그 후 chloroform isopropanol (24 : 1)을 700  $\mu$ l를 첨가하여 15 분 동안 13,000 rpm으로 원심분리하였다. 원심분리에 의해 얻어진 상등액 1.5 ml를 tube에 넣고, 70% ethanol 700  $\mu$ l로 세척한 다음 13,000 rpm으로 15 분 동안 원심분리를 하였으며, 침전된 DNA를 제외한 나머지 물질들을 제거하였다. 실온에서 ethanol이 완벽히 제거될 때까지 건조시키고 멸균증류수 50  $\mu$ l를 넣고 다음 실험까지 -70°C에 보관하였다 (Doyle, 1990).

밤나무 근권토양 분리균과 인삼에서 분리된 CY8005, CY8014, CY8073 균주의 histone h3 영역을 PCR 증폭을 위하여 제작된 CYLH3F와 CYLH3R primer를 이용하여 PCR을 수행하였다 (Crous *et al.*, 2004).

증폭된 PCR 산물은 Macrogen (Daejeon, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰한 후, 미국 국립생물정보센터 (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 이용하여 NCBI에 등록된 병원균의 염기서열과 비교하였다.

또한 유연관계 분석을 위한 염기서열은 MEGA 6 program (Tamura *et al.*, 2013)을 이용하여 alignment를 실시하여 일치하지 않은 염기서열은 분석에서 제외하였다. 1,000 회의

bootstrap 분석을 통해 신뢰도를 평가하였으며, 새롭게 종이 분류된 *I. radicola* species complex를 대조균주의 DNA 염기 서열로 사용하였다 (Cabral *et al.*, 2012).

## 결과 및 고찰

### 1. 밤나무 근권토양의 병원균 검출

공주 5 곳의 밤나무 포장으로부터 각각 20 개의 밤나무 근권토양 시료를 채집하여 *Ilyonectria radicola*가 존재하는 토양을 선별하고 병원균을 얻기 위하여 nested PCR 방법을 활용하여 PCR 검정을 수행하였다 (Fig. 1).

Hamelin 등 (1996)은 소나무 유묘에서 *Cylindrocarpon destructans*의 존재여부를 판단하기 위하여 internal transcribed spacer (ITS) 영역으로부터 399-400 bp의 증폭산물을 나타내는 primer set를 디자인하여 외부는 ITS 1, 4 primer set로 증폭시키고, 이 증폭산물을 dest 1, 4 primer set로 인삼뿌리썩음병균을 검출할 수 있는 nested PCR법을 실시한 바 있다.

Jang (2005)은 이들 마커를 활용하여 인삼재배 예정지의 토양으로부터 인삼뿌리썩음병균의 존재를 판단하는 시스템을 개발한 바 있다. 5 지역 밤나무 포장의 모든 곳에서 *I. radicola*의 존재가 확인되었으며, 100 개의 토양시료 중 35 개의 토양시료에서 400 bp의 증폭산물을 나타내는 병원균의 존재를 확인할 수 있었다.

Jun (2009)은 밤나무 뿌리의 썩은 부위와 근권토양으로부터 *C. destructans*를 검출해 밤나무가 인삼뿌리썩음병을 일으키는 *C. destructans*의 기주일 가능성을 확인하는데 이번 실험을 통해 그 점을 확실하게 밝혀내었다.

### 2. 유연관계 분석을 통한 밤나무 근권토양 분리균의 종 동정

밤나무 근권토양에서 *I. radicola*의 존재를 확인한 토양으로부터 반선택배지를 이용하여 균 분리를 하였으며 (chestnut 7, 11, 12, 17, 18 and 24), histone h3 영역의 유연관계분석을 실시하여 종 동정을 실시하였다 (Fig. 2).

Seifert 등 (2001)은 ITS 영역의 염기서열을 이용해 *C. destructans* complex 내에 한국, 일본 및 미국의 인삼분리균만을 포함하는 그룹과 다른 기주들로부터 분리된 그룹으로 나누었으며, Seo (2009)는 국내 인삼으로부터 분리된 *C. destructans*의 ITS 염기서열 분석을 통해 인삼 분리균을 포함하는 그룹 이외에도 다른 기주에서 분리된 *C. destructans*와 한 그룹을 이루는 균들을 확인하였다.

최근에는 새로운 분류체계에 의해 *I. mors-panacis*, *I. robusta*, *I. panacis*와 *I. crassa* 등 4 종이 인삼으로부터 분리된 종으로 확인된 바 있다 (Cabral *et al.*, 2012). 또한 국내에서는 인삼뿌리썩음병균의 재분류를 통해 *I. mors-panacis*, *I. robusta*, *I. liriodendri*, *I. cyclaminicola*와 두 그룹의 미동정

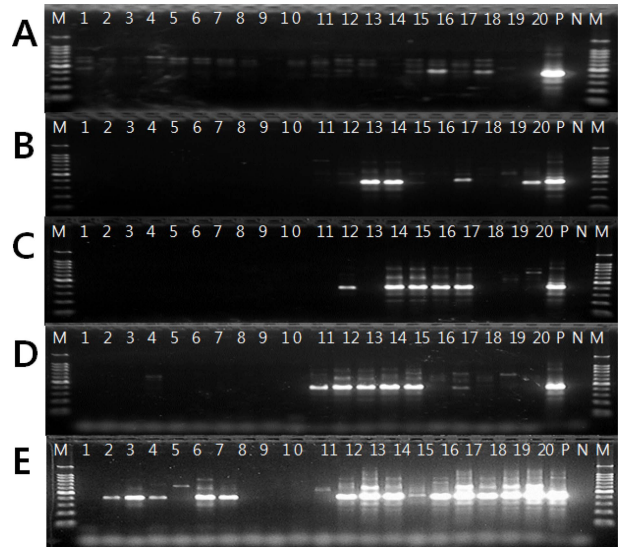


Fig. 1. PCR detection of *Ilyonectria radicola* from rhizosphere soil of chestnut tree using nested PCR with dest 1, 4 primer set. A; Gongju Suksongli, B; Gongju Nechonli, C; Gongju Jangwonli, D; Gongju Daesanli, E; Gongju Nemoonli, M; 100 bp ladder, P; positive control, N; negative control, lane 1 - 20; DNA isolated from rhizosphere soil of each chestnut tree.

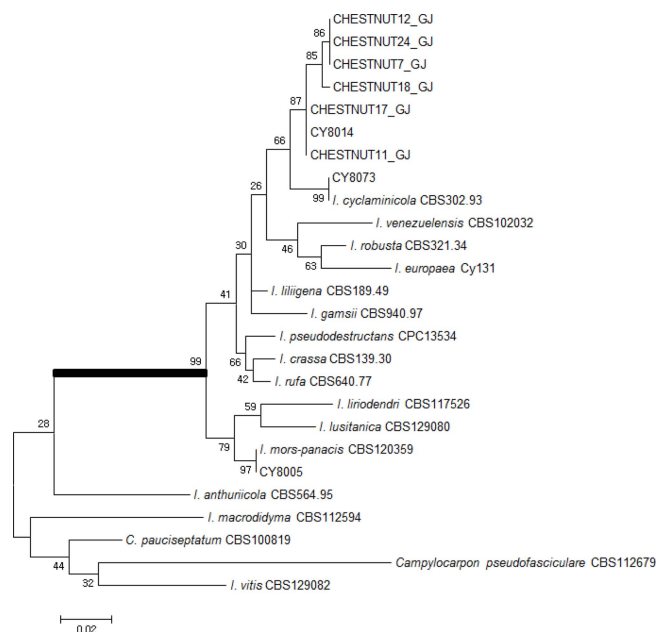


Fig. 2. Phylogenetic analysis of *Ilyonectria radicola* species complex obtained from chestnut tree rhizosphere soils using histone h3 sequence region. The unidentified isolates of chestnut rhizosphere soils were in the same group as the existing ginseng isolate *I. radicola* complex. The bootstrap analysis was performed with 1,000 replications.

종을 보고하였다 (Seo, 2017).

밤나무 근권토양으로부터 분리된 균들은 모두 새로운 분류



Fig. 3. Pathogenicity on ginseng roots by chestnut 11 isolate from chestnut rhizosphere soil. 4 Weeks (a), 6 weeks (b), 8 weeks (c) and 12 weeks (d) after inoculation, respectively.

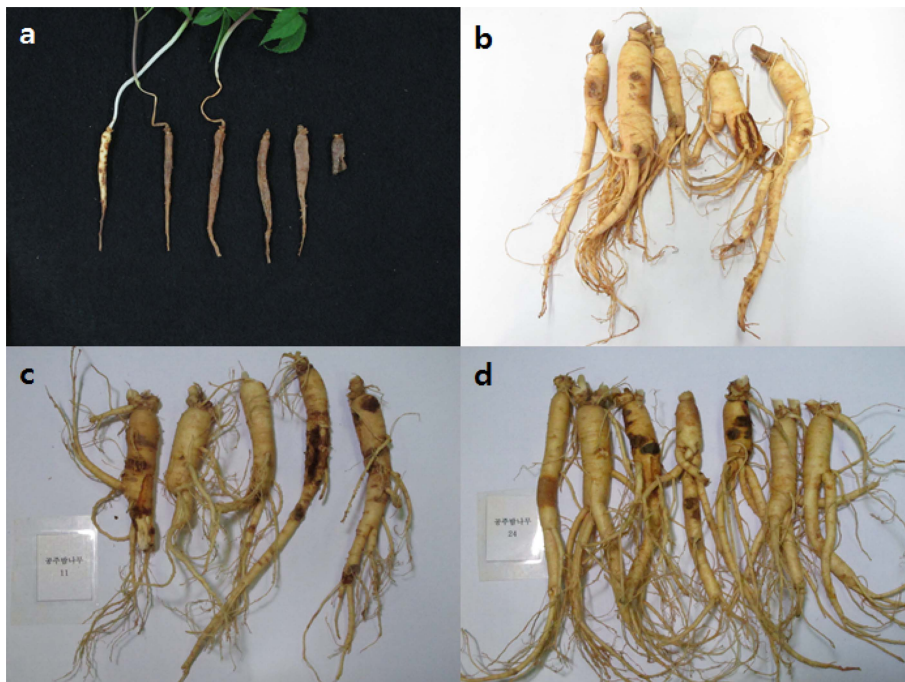


Fig. 4. Optical images showing symptoms of root rot due to *Ilyonectria radicola* affected by highly (a) and weakly (b, c and d) aggressive *I. radicola* isolates *in vivo* on field cultivating ginseng roots. Ginseng roots were inoculated by CY8005 (a, 6 weeks), CY8073 (b, 3 years), chestnut 11 (c, 3 years) and chestnut 24 isolate (d, 3 years) after inoculation.

체계에 의해 *I. radicola* complex 내에 모두 포함되었으며, 시클라멘에서 분리한 *I. cyclaminicola*와 가장 근연의 종을 이

루었다.

Seo (2017)는 인삼분리균 중 *I. cyclaminicola*를 분리한 바

**Table 1.** Pathogenicity of Korean ginseng *Ilyonectria mors-panacis*, *I. cyclaminicola* and *I. radicola* species complex (chestnut 11, chestnut 24) originated from chestnut rhizosphere soils

Species	Disease severity <sup>1)</sup>	
<i>Ilyonectria mors-panacis</i> CY8005	100	++++
<i>I. cyclaminicola</i> CY8073	12.5	++
Chestnut 11	27.5	+++
Chestnut 24	22.0	+++

<sup>1)</sup>-; (no infection), +; (1 - 10%), ++; (11 - 20%), +++; (21 - 30%), ++++; (31% >).

있으며, 이들로부터 병원성을 확인하였다. 또한 밤나무 근권토양에서 분리된 균주가 인삼에서 분리된 CY8014와 유전적으로 일치하는 것으로 보아 밤나무 또는 밤나무 근권토양에서 존재하는 병원균이 인삼밭으로 유입하여 인삼에 뿌리썩음병을 일으킬 수 있는 가능성을 보여주었다.

### 3. 밤나무 근권 분리균의 인삼에 대한 병원성

포장검정을 통해 밤나무 근권토양으로부터 분리된 *I. radicola* 균이 인삼에 직접 침입하여 병을 일으키는 것을 확인하였다 (Fig. 3 and 4, Table 1).

인삼에 대하여 강병원성 균으로 알려진 *I. mors-panacis*로 동정이 된 CY8005 균주의 경우에는 병 접종 6 주 후, 발병도가 100%로 모두 썩은 반면 밤나무 근권토양에서 분리된 병원균들은 접종 초기에는 CY8005에 비하여 병의 진전은 없었지만, 시간이 지남에 따라 인삼에 약하게 뿌리썩음병을 일으켰다. 또한 인삼에 대하여 약병원성인 *I. cyclaminicola*로 분류된 CY8073과 비교하였을 때 초기 병 진전속도는 느리지만, 병 접종 3 년 후에 인삼에 병을 야기하는 것을 확인하였다.

국내 작약에서 분리한 *I. robusta*가 인삼에 뿌리썩음병을 일으킨다는 보고가 있다 (Seo *et al.*, 2017). 이는 기존 인삼에서 분리된 *I. mors-panacis*, *I. panacis*, *I. robusta*, *I. crassa* 등 4 종 중 하나로 인삼에 뿌리썩음병을 일으킬 수 있는 가능성이 컸지만, 이번 밤나무 근권으로부터 분리된 균 (*I. radicola* complex)은 지금까지 보고된 인삼 병원균이 아님에도 인삼에 뿌리썩음병을 일으키는 것을 확인하였다.

이에 따라 인삼 재배지 선정 시, 기존에 보고된 인삼, 작약, 딸기 이외에 밤나무 재배지도 회피하여 인삼뿌리썩음병을 예방할 필요가 있다고 판단된다.

### 감사의 글

This study was supported by research fund of Chungnam National University, Korea.

### REFERENCES

Booth C. (1966). The genus *Cylindrocarpon*. Mycological Papers. 104:1-56.

Cabral A, Groenewald JZ, Rego C, Oliveira H and Crous PW. (2012). *Cylindrocarpon* root rot: Multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. Mycological Progress. 11:655-688.

Cho DH, Park KJ, Yu YH, Ohh SH and Lee HS. (1995). Root-rot development of 2-year old ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) caused by *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten in the continuous cultivation field. Korean Journal of Ginseng Science. 19:175-180.

Choi SY, Park KS, Kim KJ and Kim JC. (2004). Occurrence and control of black root rot of peony (*Paeonia lactiflora*) on continuous cropping. Research in Plant Disease. 10:268-271.

Crous PW, Groenewald JZ, Risede JM, Simoneau P and Hywel-Jones NL. (2004). *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: Species with sphaeropedunculate vesicles. Studies in Mycology. 50:415-430.

Doyle JJ. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12:13-15.

Hamelin RC, Bérubé P, Gignac M and Bourassa M. (1996). Identification of root rot fungi in nursery seedlings by nested multiplex PCR. Applied and Environmental Microbiology. 62:4026-4031.

Jang CS. (2005). Development of diagnostic system for root rot disease of ginseng caused by *Cylindrocarpon destructans* using nested PCR from soil. Master Thesis. Chungnam National University. p.7-10.

Jun NJ. (2008). Study on new host range and genetic diversity for ginseng root rot pathogen, *Cylindrocarpon destructans* in Korea. Master Thesis. Chungnam National University. p.27-40.

Kang SW, Yeon BY, Hyeon GS, Bae YS, Lee SW and Seong NS. (2007). Changes of soil chemical properties and root injury ratio by progress years of post-harvest in continuous cropping soils of ginseng. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 15:157-161.

Lee SW, Lee SH, Park KH, Jang IB, Jin ML and Seo MW. (2017). Effect of crop rotation system on soil chemical properties and ginseng root rot after harvesting ginseng. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 25:244-251.

Lee SW, Lee SH, Park KH, Jin ML, Jang IB and Kim KH. (2015). Inhibition effect on root rot disease of *Panax ginseng* by crop cultivation in soil occurring replant failure. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 23:223-230.

Lee SW, Park KH, Lee SH, Jang IB and Jin ML. (2016). Crop rotation in paddy soil exhibiting crop failure following replanting: Effect on soil chemical properties, soil microbial community and growth characteristics of 2-year-old ginseng. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 24:294-302.

Matuo T and Miyazawa Y. (1984). Scientific name of *Cylindrocarpon* sp. causing root rot of ginseng. Japanese Journal of Phytopathology. 50:649-652.

Punja ZK. (1997). Fungal pathogens of American ginseng (*Panax quinquefolius*) in British Columbia. Canadian Journal of Plant Pathology. 19:301-306.

- Reeleder RD, Roy R and Capell B.** (2002). Seed and root rots of ginseng(*Panax quinquefolius* L) caused by *Cylindrocarpon destructans* and *Fusarium* spp. *Journal of Ginseng Research*. 26:151-158.
- Seifert KA, McMullen CR, Yee D, Reeleder RD and Dobinson KF.** (2003). Molecular differentiation and detection of ginseng-adapted isolates of the root rot fungus *Cylindrocarpon destructans*. *Phytopathology*. 93:1533-1542.
- Seo MW, Song JY, Kang KH, Park SY, Kim SI and Kim HG.** (2017). Virulence assays and genetic reclassification to assess the pathogenicity of *Cylindrocarpon destructans* isolated from peony in ginseng. *The Korean Journal of Mycology*. 45:132-138.
- Seo MW.** (2009). Analysis of characteristics for Korean ginseng root rot pathogen(*Cylindrocarpon destructans*) and development of new diagnostic molecular marker. Master Thesis. Chungnam National University. p.28-35.
- Seo MW.** (2017). Reclassification and disease occurrence factor in first planted field of Korean ginseng root rot pathogen population(*Cylindrocarpon destructans*) and practical disease diagnosis. Ph. D. Thesis. Chungnam National University. p.28-34.
- Singleton LL, Mihail JD and Rush CM.** (1992). Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. *In* Jeanne M. *et al.* APS Press. St. Paul. MN, USA. p.140-141.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipksi A and Kumar S.** (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30:2725-2729.
- The Korean Society of Plant Pathology(KSPP).** (2009). List of plant diseases in Korea. The Korean Society of Plant Pathology. Seoul, Korea. p.91-288.