

병원성 검정 및 RAPD 분석에 의한 국내 인삼뿌리썩음병균(*Cylindrocarpon destructans*)의 유전적 다양성

서문원¹ · 김선익² · 송정영¹ · 김흥기^{1*}

¹충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과
²금산인삼약초시험장

Genetic Diversity of Korean *Cylindrocarpon destructans* Based on Virulence Assay and RAPD Analysis

Mun Won Seo¹, Sun Ick Kim², Jeong Young Song¹ and Hong Gi Kim^{1*}

¹Department of Applied Biology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

²Keumsan Ginseng & Medicinal Crop Experiment Station, Keumsan 312-822, Korea

(Received 15, March 2011., Accepted 19, March 2011)

ABSTRACT : Ginseng root rot caused by *Cylindrocarpon destructans* is one of the most destructive diseases of ginseng (*Panax ginseng*). We analyzed the features of the species through pathogenicity test and genetic diversity analysis of *C. destructans* in Korea, for its application as basic data to attempt for effective control. *C. destructans* isolated from rotted ginseng roots exhibited a variety of colonial colors on media. It was assumed that there may exist genetic diversity in the population by the diversity of pathogenicity among isolates observed when artificially inoculated into ginseng roots. Pathogenicity tests using *ex vivo* wound inoculation with agar mixture inoculation on ginseng roots were performed similar results as were observed appear to be useful for rapid pathogen inspection. According to RAPD analysis results, Korean *C. destructans* isolates formed a single genetic group which can be distinguished readily from closely related other fungi. *C. destructans* group was divided into two small groups. Therefore, we were able to confirm pathogenicity and genetic difference between the isolates in each of the groups of the pathogen.

KEYWORDS : *Cylindrocarpon destructans*, Genetic diversity, Ginseng root rot, Pathogenicity test, RAPD analysis

서 론

인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 다년생의 숙근초인 음지성의 약용식물로서 3~5년간 동일 포장에서 장기간 재배하여야 하기 때문에 뿌리썩음병을 비롯한 각종 병해에 의한 피해가 매우 크고 이에 따라 연작장해의 발생가능성이 높아 대다수의 농가에서는 주로 초작지에서의 인삼 재배를 선호하고 있다(조 등, 1994; 목, 2000).

특히 뿌리썩음병과 연작장해를 일으키는 여러가지 토양 병해에는 *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium solani*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas fluorescens* 등의 병원균이 복합적으로 관여한다고 보고되어 있으나, 강한 병원성과 침략력을 가진 *C. destructans*에 의한 1차적인 감염이 연작장해의 가장 중요한 원인이며, 이 균의 밀도증가가 인삼뿌리썩음병의 최대요인으로 밝혀져 있다(정, 1979; 홍 등, 1992; Chung and Kim, 1980). 따라서 인삼의 안정적인 다수확의 최대 저해 요인인 *C. destructans*의 효과적인 방제가

인삼 재배 성공의 최대 관건이 되고 있다.

국내 인삼뿌리썩음병의 주된 원인균인 *C. destructans*는 미국삼(*Panax quinquefolium*) 뿐만 아니라(Zinssmeister, C. L., 1918) 일본의 인삼에도 병을 일으키는 것으로 알려져 있어(Matsuo and Miyazawa, 1969) 그 피해의 심각성을 짐작할 수 있다.

인삼뿌리썩음병의 병원학적 연구는 *C. destructans*가 주로 토양이나 수목, 작물의 근권에 서식하는 균으로 보고되어져 왔으며, 병원성균과 비병원성균이 일반적인 토양과 인삼 주위에 부생적으로 생육을 하며 물리적 장해나 상처, 선충 등과 같은 원인에 의해 표피가 손상이 되면 병이 야기된다고 하였다(Zinssmeister, C. L., 1918; Dahm and Strzelczyk, 1987; Rahman and Punja, 2005). 또한 인삼에 침입 시 펙티나아제, 셀룰라아제의 분비 여부에 따라서 병원성의 유무를 판단하기도 하였으며(이, 1974; Rahman and Punja, 2005), phytotoxin인 nectrolide를 분비하여 인삼의 세포를 죽인 후 침입하는 것으로도 알려져 있다(Evans *et al.*, 1967).

*C. destructans*는 다른 토양병원균과 같이 매우 느리게 자라며 인삼과 침입수의 기주에 각각 강하거나 약한 병원

*Corresponding author <E-mail : hgkim@cnu.ac.kr

성으로 존재하는데(Hildebrand, 1935; Seifert *et al.*, 2003), *Cylindrocarpon* 속내의 *C. destructans*의 유전적인 분류체계는 잘 정립이 되어있지만(Samuels and Brayford, 1990; Mantiri *et al.*, 2001; Seifert *et al.*, 2003), 기주가 인삼 이외엔 대부분 경제성이 낮아 연구자들의 관심도가 낮았기 때문에 유전적 차이, 병원성, 기주범위 등 병원균에 대한 특성 분석이 미비한 실정이다. 또한 국내의 연구가 그동안 미흡했던 이유는 토양 내 존재형태인 후벽포자의 발아율이 낮고 토양 내에서 균을 분리하는 것조차 어려웠기 때문이다(유 등, 1995).

따라서 본 연구는 국내 인삼에 발병하는 *C. destructans* 집단에 대하여 물리적 상처나 환경적 요인, 접종시기에 따른 병원성 차이를 확인하고자 병원성 검정 방법을 달리하여 균의 병원성 분석 시 효율적인 실험 방법을 제시하려고 하였으며, RAPD 분석을 통하여 이들 균주들간 병원성과 지역별 유전적 관계 및 다양성을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 수집 및 병원균 분리

*C. destructans*는 충남 금산을 비롯한 전국의 인삼 주산지 포장에서 전형적인 뿌리썩음병 증상을 보이는 병든 인삼으로부터 분리하였다(Table 1).

채집된 인삼에서 갈색 병반의 조직을 흐르는 물에 수세하고, 건전부위와 부패부위의 조직을 5 mm 크기로 절단하여 2% NaOCl에 1분간 침지하여 표면소독을 하였고, 멸균수로

Table 1. A list of isolates of *Cylindrocarpon destructans* used in this study

Isolate	Geographic origin	Age of ginseng
CY001	Wanju, Jeonbuk	4
CY003	Yeoju, Gyeonggi	6
CY006	Geumsan, Chungnam	4
CY008	Icheon, Gyeonggi	4
CY010	Goesan, Chungbuk	4
CY030	Yeongju, Gyeongbuk	4
CY033	Icheon, Gyeonggi	6
CY036	Goesan, Chungbuk	4
CY037	Okcheon, Chungbuk	4
CY050	Boryeong, Chungnam	3
CY051	Goesan, Chungbuk	4
CY055	Boryeong, Chungnam	3
CY060	Goesan, Chungbuk	4
CY063	Hongcheon, Gangwon	6
CY066	Goesan, Chungbuk	4
CY075	Yangju, Gyeonggi	6
CY076	Goesan, Chungbuk	4
CY080	Hoengseong, Gangwon	4

2~3회 세척한 다음 여과지 위에 놓아 수분을 제거하였으며, 표면소독이 된 병든 조직을 water agar 또는 PCNBA배지에 올려놓고(Punja, 1997), 15에서 7일간 배양하였다. 배양된 조직에서 자라 나온 균사 중 단균사를 떼어 PDA 배지에 재분리 하였고, 이것을 15에서 10일간 배양한 후 단포자 분리를 실시하였다. 또한 PDA배지에 접종하여 20로 2주일간 배양한 후 PDA 배지에 재접종하였으며, 1주일 간격으로 균총의 형태와 색, 소·대형분생포자, 후벽포자 등의 형성여부 및 그 특징 등을 조사하였다.

*C. destructans*의 genomic DNA 분리

공시균주들을 순수분리한 다음 genomic DNA를 분리하기 위해 potato dextrose broth (PDB) 배지에 접종하여 20°C에서 정치 배양하였다. 균사를 수확하여 1.5 ml eppendorf tube에 나누고 동결 건조시켜 마쇄한 후, Doyle 등(1990)의 방법을 적용하여 *C. destructans*의 genomic DNA를 분리하였다.

공시균주의 종 동정

*C. destructans*의 동정은 분자생물학적 기법을 이용하는 것이 시간과 경비를 절감하는 것에 유리하기 때문에 본 연구에서는 일반적인 형태적 동정과 함께 종 동정을 위해 인삼분리균들의 DNA를 기존에 보고된 종 특이적 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. Hamelin 등(1996)이 식물체로부터 *C. destructans*를 검출하기 위해 개발한 종 특이적 primer (ITS1/ITS4 primer set와 Dest1/Dest4 primer set)를 이용한 nested PCR을 수행하여 균주의 동정을 실시하였다. PCR 조건은 ITS1/ITS4 primer set의 경우, 95°C에서 3분간 denaturation 후, 95°C 35초, 55°C 1분, 72°C 2분으로 35cycle 증폭하였으며, 이후 72°C에서 8분간 두어 반응을 완결하였고, Dest1/Dest4 primer set의 경우는 annealing 62°C 1분, 30cycle 증폭하였고 다른 조건은 ITS1/ITS4 primer set과 동일하게 반응시켜 gel electrophoresis로 PCR 산물을 확인하였다.

실내 검정

*C. destructans*로 동정된 균주들의 병원성을 조사하기 위하여 2% NaOCl로 표면 소독되어진 2년근 인삼을 준비하였으며 접종원은 균주를 PDA 배지에 접종 후 20에서 14일간 배양하여 사용하였다. 밀폐용기를 70% 에탄올로 소독 후에 고압멸균(121°C, 1.2기압, 15분)한 멸균수 50 ml를 적셔놓은 티슈를 깔고 배양된 균사를 cork borer(직경 5 mm)로 떼어 내어 인삼표면에 올려놓은 후 밀봉하여 보관하였다. 20°C 항온기에서 4주간 보관한 후 이병정도를 관찰하였다. 또한 상처접종은 배양된 균사를 떼어내어 white tip을 이용하여 인삼에 상처를 내고 고정시켰으며, 위와 동일한 방법으로 이병정도를 관찰하였다.

포장 검정

병든 조직에서 분리하여 *C. destructans*로 동정된 균주들의

병원성 유·무 및 그 차이를 조사하기 위하여 묘삼을 준비하였으며 접종원은 균주를 PDA 배지에 접종 후 20°C에서 14일간 배양하여 사용하였다. 배양된 균사조직을 멸균수 40 ml와 함께 마쇄한 균사현탁액에 묘삼을 침지시킨 후 충남 금산에 위치한 예정지 관리된 포장에 4월에 이식하여 7개월 후 이병주율을 확인하였다.

RAPD 분석

병원균의 유전적 유연관계를 알아보기 위하여 URP primer 12개와 OPA 10개를 사용하여 RAPD 분석을 실시하였다. RAPD 분석을 실시한 결과를 토대로 밴드 양상의 차이가 뚜렷이 나타나는 3개의 primer, URP-01, URP-03, URP-09를 선발하였다. URP primer set는 주서린과학의 제품을 사용하였다.

RAPD에 의해 얻어진 DNA polymorphism은 밴드 유무에 따라 0과 1로 나열하여 컴퓨터에 입력할 data로 작성하였다. 이 data는 NTSYS program을 이용하여 아래와 같은 공식으로 유사도를 구하였고, 그것을 기반으로 UPGMA에 의한 집괴 분석을 실시하였다(Ver. 1.70, Rohlf, 1992).

$$\text{Similarity coefficients} = 2n_{xy} / (n_x + n_y).$$

n_x, n_y : Number of fragment in each strain.

n_{xy} : Number of fragments shared by the compared strains.

결과 및 고찰

인삼뿌리썩음병균의 동정

전국의 주요 인삼 포장으로부터 얻어진 인삼뿌리썩음 병균으로부터 18개의 공시균주들을 얻었다(Table 1). 공시균주들의 *C. destructans*는 배지상에서 소형분생포자, 대형분생포자 그리고 후벽포자의 생성유무와 형태적 특징으로 다른 유사균들 및 *Cylindrocarpon* 속의 다른 종들과 구분되어 진다(Booth, 1966). 본 실험에 사용된 균주들은 모두 소형분생포자와 세포벽이 두터운 후벽포자가 관찰되었으며 균총색이 다양하게 나타났지만(data not shown), 추후 이들 균주들은 담갈색과 암갈색의 균총을 형성하여 *C. destructans*로 동정되었다.

*C. destructans*의 동정은 배양시간의 절약과 포자 유도의 어려움 등으로 분자생물학적 기법을 이용하는 것이 동정에 매우 유리하다. 따라서 병든 인삼에서 분리된 공시균주들을 동정하고자 DNA를 수거하여 기존에 *C. destructans* 종 특이적 primer로 보고된 Dest1/Dest4 primer(Hamelin *et al.*, 1996)를 이용한 nested PCR을 수행한 결과 인삼 분리균들로부터 모두 400 bp 크기의 증폭산물들을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

실내 검정

병든 인삼조직에서 분리된 인삼뿌리썩음병균(*C. destructans*)의 병원성을 조사하기 위하여 인삼에 무상처 접종 후 20°C 항온기에서 4주간 보관하여 관찰하였다. 대부분의 균주들이

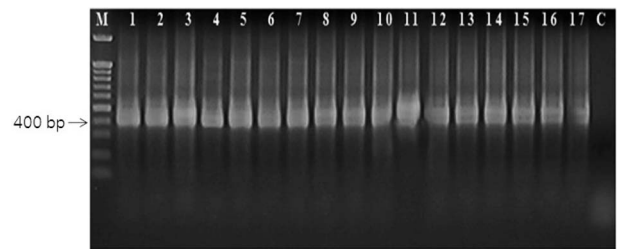


Fig. 1. Nested PCR amplification for the identification of *Cylindrocarpon destructans* isolates from agar using ITS and Dest primers. M, 100 bp ladder; lanes 1-17, *C. destructans* isolates; C, Negative control.

병반을 형성하지 못하였지만 CY037, CY080 균주만이 약한 갈색의 인삼뿌리썩음병반을 형성하였다(Table 2). 오 (1981)의 주장처럼 이미 인삼뿌리썩음병균에 의한 인삼뿌리썩음병은 발병 특성상 매우 천천히 느리게 진행되고, 다른 토양병원균과 마찬가지로 매우 느리게 자라는 균으로(Hildbrand, 1935; Seifert *et al.*, 2003) 무상처 접종 시 전형적인 인삼뿌리썩음병반의 관찰이 쉽지 않았고, 무상처 접종을 통한 병원성 검정을 위해서는 접종기간을 더 늘려야 할 것으로 생각된다.

상처접종을 통한 공시균주들의 2년근 인삼에 대한 병원성을 조사한 결과 공시균주들 간에 접종부위에서 병반의 크기 차이에 따른 상대적인 병원성 차이가 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 2; Table 2).

연작지에서의 2년근 인삼포장에서 인삼뿌리썩음병 발생이 가장 많이 나타나며(Cho *et al.*, 1995), 병원성 검정에 2년근이 가장 효과적이라는 Rahman 등(2005)의 주장과 같이 본 실험에서 사용한 상처접종을 통한 병원성 검정은 무상처 접종보다 2년근에서의 공시균주들 간에 병원성 차이를 더욱 뚜렷하게 구분할 수 있었고 병원성 관찰시간도 단축시킬 수 있었다.

또한 인삼의 결주를 발생시키는 주요 원인으로는 해충에 의한 가해(김 등, 1988), 토양수분의 과부족 및 토양의 무기물과 미부족에 의한 생리장해 및 염주장해 등(정 등, 1978; 목 등, 1981; 정 등, 1984)이 알려져 있고, 현재까지 인삼에 밝혀진 주요병해는 바이러스 1종, 세균 8종, 진균 19종이 알려져 있다(한국식물병명목록, 2009). 이들 병해 중 대다수가 주로 뿌리를 침해하는 병해로 이들은 기상조건, 지역적 토양오염 정도에 따라 국부적, 집단적으로 발생하여 피해를 주고, 토양의 물리적 악화와 이화학성의 부적합이 복합적으로 발생한다고 하였다(정, 1979; 오, 1981; 유 등, 1993). 따라서 실내 상처접종에 의한 결과가 포장 검정의 병원성이 대다수 유사였으며, 실내 검정은 다른 토양 병원균의 단절과 환경적인 요인을 차단함으로써 보다 정확하고 신속한 *C. destructans*의 병원성 검정에 유리하다고 판단된다.

포장 검정

재배예정지로 관리된 포장에서 수행된 공시균주들의 검정 결과는 실내 병원성 조사 결과와 유사하게 나타났다. 모든 공

Table 2. Pathogenicity of *Cylindrocarpon destructans* isolates on ginseng roots *ex vivo* and *in vivo*

Isolate	<i>Ex vivo</i> ^x		<i>In vivo</i> ^y
	Non-wounded	Wounded	Mixed with inoculum
CY001	-	+	++
CY003	-	+	++
CY006	-	+++	+++
CY008	-	++	+++
CY010	-	++	+++
CY030	-	+	++
CY033	-	+++	+++
CY036	-	++	+++
CY037	+	+++	+++
CY050	-	++	+++
CY051	-	+	+++
CY055	-	++	+++
CY060	-	++	+++
CY063	-	+	+
CY066	-	+++	++
CY075	-	++	+++
CY076	-	++	+++
CY080	+	++	+
N.C ^z	-	-	-

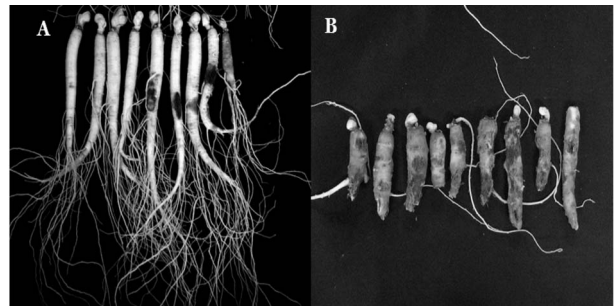
^x-, (No symptom); +, (> 4.5 mm); ++, (4.5-9.0 mm); +++, (> 9.0 mm); Lesion length on ginseng root was surveyed on 4 weeks after inoculation.

^y-, (No symptom); +, (1-40%); ++, (41-80%); +++, (> 80%). Diseased root rate was surveyed 7 months after inoculation.

^zNon-treated control.

**Fig. 2.** Symptoms of root rot caused by *Cylindrocarpon destructans* on wounded 2 years old ginseng *ex vivo*. A, Negative control; B, + (weakly virulent isolates, CY001 and CY030); C, +++ (highly virulent isolates, CY066 and CY033).

시균주들은 최소 16.7%의 이병주율을 나타냈고, 18균주 중 4 균주를 제외한 균주들은 50%가 넘는 이병주율이 나타나 인삼에 대한 강한 병원성을 확인 할 수 있었다(Fig. 3; Table 2). 그리고 상대적으로 병원성이 약한 공시균주들에 의해 형성된 이병부위라 할지라도 절개 시 내부로 병반이 진전되어져 있어 *C. destructans*의 전형적인 뿌리썩음병반을 확인할 수 있었다.

**Fig. 3.** Diseased ginseng roots by weakly (A, CY001) and highly (B, CY033) virulent *Cylindrocarpon destructans* isolates.

뿌리썩음병에 의한 피해는 초작지의 결주율이 4년생 21.8%, 6년의 경우 50% 이상 발생하며, 재작지의 경우 1~2년생 30~80%의 결주가 발생하고, 4년생은 인삼 대부분에 병이 발생하거나 소실된다고 하였다(Chung, 1972; 유 등, 1996). 이는 재배 특성상 재식 후 최소 2~3년 이상 더 오래 재배되는 점을 고려할 때 재배 포장에서 초기 약한 병 발생이 나타났다고 할지라도 수확 시 이들에 의한 병 발생으로 인하여 피해는 매우 클 것으로 판단된다. 이는 대다수의 균주들이 포장 검정의 경우, 실내 검정보다 오랜 시간을 두었기 때문에 병원성이 보다 강하게 나타나는 것으로 확인을 할 수 있었다.

유연관계 분석

본 실험에 사용되어진 인삼뿌리썩음병균(*C. destructans*) 집단에 대해 DNA 수준에서의 유전적 특성을 알아보고자 URP-1, URP-3, URP-9를 이용하여 PCR 분석을 하였다(Fig. 4). 18개의 *C. destructans* 균주들은 근연종인 *C. candidum* KCTC16046, *C. album* KCTC16047, *C. heteronema* KCTC16048을 비롯한 *Fusarium solani* CNU-FSPA103, *F. oxysporum* CNU-FORL18 균주들과는 달리 하나의 그룹을 형성하였으며, 전(2008)의 결과와 마찬가지로 이 그룹 내에서도 2개의 소그룹을 형성하였고, 소그룹 내에서도 유전적 다양성이 존재함을 알 수 있었다. 이들 2개의 소그룹 중 경기도(CY008, CY033, CY075), 충청남도(CY050, CY055), 충청북도(CY037, CY051, CY060, CY066, CY076)의 균주들이 하나의 그룹을 형성하였고, 충청남도 금산(CY006), 충청북도 괴산(CY010, CY036)균주를 제외한 다른 하나의 그룹보다 비교적 병원성이 높게 나타났고 이를 통하여 유연관계 분석을 통한 유전적 변이와 병원성이 관련이 될 것이라 판단되지만, 보다 이들의 세부적인 관계를 확인하기 위해서는 더 많은 균주의 병원성 검정과 다양한 영역의 시퀀스를 통한 분석이 필요할 것이다. 또한 충청남도 괴산의 균주들의 경우, 두 개의 그룹에서 고루 분포하여 *C. destructans*의 유전적 다양성이 다양하게 분포하였다.

적요

국내 인삼뿌리썩음병균(*Cylindrocarpon destructans*)은 인

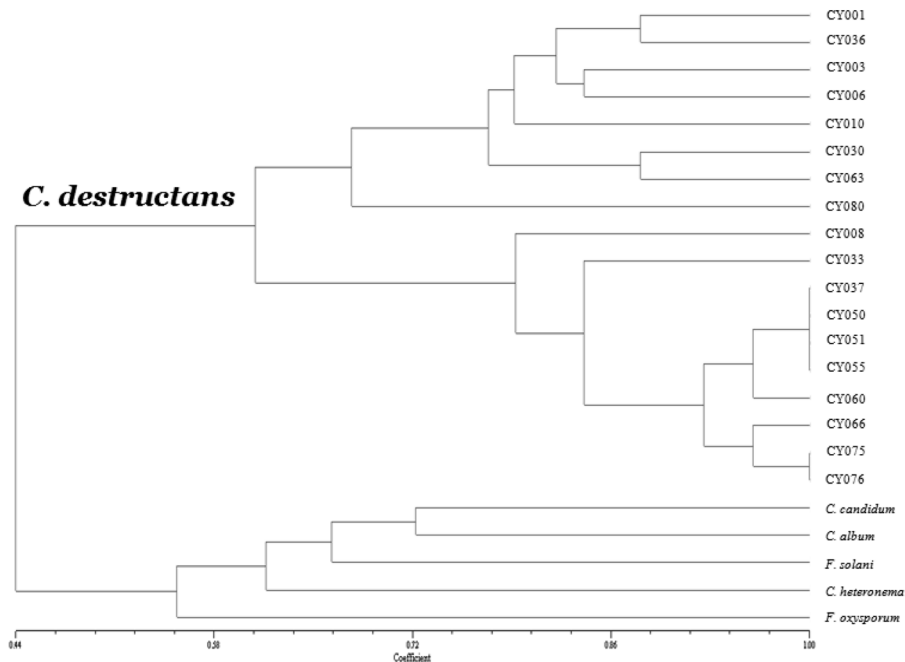


Fig. 4. Dendrogram showing relationships among the Korean *Cylindrocarpon destructans* isolates. Genetic distance was obtained by RAPD using URP-1, URP-3 and URP-9 primer sets.

삼에 가장 심각한 병을 야기하는 병원균 중의 하나이다. 인삼뿌리썩음병의 효과적인 방제를 위한 기초 연구 자료로 활용하고자 병원성 검정 및 유전적 다양성 분석을 통해 국내 인삼뿌리썩음병균 *C. destructans*의 중 특성을 분석하였다. 국내 인삼뿌리썩음병균으로부터 분리된 *C. destructans* 공시 균주들은 배지상에서 다양한 균총의 형태를 나타냈다. 인삼에 인공접종 시 균주들간 병원성의 차이도 다양하게 나타나 병원균 집단내 유전적 다양성이 존재할 것으로 예상되었다. 또한 접종 방법을 달리하여 병원성 검정을 실시했을 때 실내 검정은 실외배양혼합액 접종 결과와 매우 유사하게 나타나 추후 신속하게 병원성 검정을 위해 매우 유용할 것으로 판단되었다. 국내 인삼뿌리썩음병균(*C. destructans*)의 RAPD 분석결과 유사한 균류들과 확연히 구별되는 단일 그룹을 형성하였으며, 이 병원균 집단은 두 개의 소그룹으로 크게 나뉘었고 각 그룹내 균주들 간 병원성과의 유전적 차이를 확인할 수 있었다.

참고문헌

- 김기황, 김상석, 오승환. 1988. 큰 검정풍뎡이 및 참검정풍뎡이 유충에 의한 인삼의 피해발생조사. *고려인삼학회지* 12:47-52.
- 목성균. 2000. 표준영농교본. 인삼재배, pp. 237, 농촌진흥청.
- 목성균, 박귀희. 1981. 인삼연구보고서(재배분야) pp. 263.
- 오승환. 1981. 인삼의 병해: 환경 및 기주조건과 발병과의 관계. *고려인삼학회지* 5:73-84.
- 유성준, 조진웅, 유승헌, 조재성. 1995. 인삼 근부병균 *Cylindrocarpon destructans*(Zins.) Scholt. 후막포자 발아에 관하여. *한국식물병리학회지* 11:182-183.
- 유연현, 오승환. 1993. 인삼 병 연구의 과거와 현재. *고려인삼학회지* 17:61-68.
- 유연현, 오승환. 1996. 인삼병. *최신고려인삼(재배편)* pp. 197-244. 한국인삼연구초연구원.
- 이민웅. 1974. 인삼근부병에 관한 연구(제 보). 세균류의 분포와 환경조건에 관하여. *한국미생물학회지* 12:153-158.
- 전남주. 2008. 국내 인삼뿌리썩음병균(*Cylindrocarpon destructans*)의 유전적 다양성과 새로운 기주범위 탐색. *충남대학교 대학원 석사학위논문*.
- 정영륜, 김홍진, 오승환, 박규진. 1984. 인삼근부병 억제토양 및 유발토양의 근권환경 비교. *한국식물병리학회지* 23:142-146.
- 정후섭. 1979. 인삼의 병. *한국식물병리학회 창립 15주년 기념 연구 논문* pp. 107-144.
- 정후섭, 이인원. 1978. 인삼연작장해 방지책. *전매용역보고서*.
- 조재성, 김충수. 1994. 고려인삼의 담진원환 재배에 관한 기초연구. *한국과학재단연구보고서* 1-20.
- 한국식물병리학회. 2009. *한국식물병명명목록* 제5판.
- 홍순근, 오승환, 유연현. 1992. 인삼 토양 병해충 방제 및 농약 개발 연구. *한국인삼연구초연구소 인삼연구보고서* pp. 121-160.
- Booth, C. 1966. The genus *Cylindrocarpon*. *CAB Int. Mycol. Inst. Mycol. Papers* 104:1-56.
- Cho, D. H., Park, K. J., Yu, Y. H., Ohh, S. H. and Lee, H. S. 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. *Korea J. Ginseng Sci.* 19:175-180.
- Chung, H. S. 1972. Ginseng disease in Korea. *Korea Pharmacognosy* 2:73-79.
- Chung, H. S. and C. H. Kim. 1980. Biological Control of ginseng root rot with soil amendment. *Proc. The 2nd International Ginseng Symposium* 67-74.
- Dahm, H., and Strzelczyk, E. 1987. Cellulytic and pectolytic activity of *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholt. isolates pathogenic and non-pathogenic to fir (*Abies alba* Mill) and pine (*Pinus sylvestris* L.). *J. Phytopathology* 118:76-83.

- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13.
- Evans, G., Cartwright, J. B., and White, N. H. 1967. The roduction of a phytotoxin, Nectrolide, by some root-surface isolates of *Cylindrocarpon radicicola*, Wr. *Plant and Soil* 26:235-260.
- Hamelin, R. C., Berube, P., Gignac, M. and Bourassa, M. 1996. Identification of root rot fungi in nursery seedlings by nested multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4026-4031.
- Hildbrand, A. A. 1935. Root rot of ginseng in Ontario caused by members of the genus *Ramularia*. *Can. J. Res.* 12:82-114.
- Mantiri, F. R., Samuels, G. J., Rahe, J. E. and Honda, B. M. 2001. Phylogenetic relationships in *Neonectria* species having *Cylindrocarpon* anamorphs inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Can. J. Bot.* 79: 337-340.
- Matsuo T. and Miyazawa., 1969. *Cylindrocarpon panacis* sp. nov. causing root rot of ginseng. *Ann. Trans. Mycol. Soc. Japan.* 11:109.
- Punja, Z. K. 1997. Fungal pathogens of American ginseng (*Panax quinquefolius*) in British Columbia. *Can. J. Plant Pathol.* 19: 301-306.
- Rahman, M. and Punja Z. K. 2005. Factors influencing development of root rot on ginseng caused by *Cylindrocarpon destructans*. *Phytopathology* 95:1381-1390.
- Rohlf, F. J. 1992. NTSIS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: *Exeter Publishing*, Ltd.
- Samuels, G. J. and Brayford, D. 1990. Variation in *Nectria radicicola* and its anamorph *Cylindrocarpon destructans*. *Mycol. Res.* 94: 433-442.
- Seifert, K. A., McMullen, C. R., Yee, D., Reeleder, R. D. and Dobinson, K. F. 2003. Molecular differentiation and detection of ginseng-adapted isolates of the root rot fungus *Cylindrocarpon destructans*. *Phytopathology* 93:1533-1542.
- Zinssmeister, C. L. 1918. *Ramularia* Root rots of ginseng. *Phytopathology* 8:557-571.