한 국 균 학 회 지 The Korean Journal of Mycology Research Note

배추뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)의 인공접종을 위한 효율적인 저장조건

양슬기 · 박주영 · 서문원 · 김홍기*

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

Optimal Storage Condition of Clubroot Pathogen, *Plasmodiophora brassicae* for Artificial Inoculation

Seul Gi Yang, Ju Young Park, Mun Won Seo and Hong Gi Kim*

Department of Applied Biology, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

ABSTRACT : Clubroot, caused by the obligate parasite *Plasmodiophora brassicae*, is a severe soilborne disease of Brassicaceae. Storage of clubroot gall is important for studies on pathogenicity and race identification. As the current storage method has been used for more than 100 years, a new storage method should be developed and the most efficient way maintaining pathogenicity should be determined. Effects of storage conditions with different storage periods on pathogenicity in galls of kimchi cabbage were examined in a greenhouse. The experiments were performed under six conditions and four temperatures in order to determine the most effective storage conditions for maintenance of pathogenicity. The most effective conditions for clubroot gall storage was the storage of whole gall at -70°C or storage of filtrate at the same temperature through eight layers of gauze after homogenization of the galls.

KEYWORDS : Clubroot gall, Optimal storage condition, Pathogenicity, *Plasmodiophora brassicae*, -70°C

우리나라 대표적인 채소인 배추는 뿌리혹병에 의해 가장 큰 피해를 입으며 그 원인 병원균은 *Plasmodiophora brassicae*이다. 두 종류의 포자를 가지며[1], 십자화과 작물에 감염되어 뿌리에 이상 생장을 초래하고 병 발생 후 17년까지 휴면포자가 토양 내에 생존한다고 알려져 있다[2]. 이 병은 배추를 포함해 무, 순무, 브로콜리, 양배추, 케일, 갓, 비트 등 십자화과 작물에서 발생된다[3].

*P. brassica*는 순활물기생체로 배지에서 인공배양이 되지 않아 그 연구가 매우 어렵다. 따라서 뿌리혹을 채집한 다음 그 뿌리혹을 장기보관하며 사용하는데 접종 시 냉동 보관한 뿌리혹을 갈아 휴면포자를 분리해 접종하는 방법을 사용한다. 뿌리혹을 잘 보관하는 것은 병원균의 인공접종에서 가장 중요한 문제 중 하나이다.

지금까지 배추뿌리혹병의 저장방법은 Woronin이 1877년 논문에 발표한 그대로 -20°C에서 뿌리혹 상태로 저장하는 것이 일반적이고 보편적인 방법이다[4]. 그러나 이 조건으로 오랜 시간 뿌리혹을 저장하면 병원균의 특성이나 병원성의 변화 등으로 인해 뿌리혹병균의 특성 연구를 정확히 수행할 수 없고 병원균을 다른 기주에 재접종할 때 기주, 환경 등 다양한 요인에 의해 그 병원성이 변화될 위험도 무시할 수 없다. 이처럼 오래 전부터 보편적으로 해왔던 방식이라고 해도 약 140년 전에 사용했던 방법을 검증과정 없이 그대로 따라하는 것 역시 문제가 있기 때문에 뿌리혹병균을 보관하는 가장 효율적인 방법을 찾을 필요가 있다.

공시균주

배추뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)의 공시균주

Kor. J. Mycol. 2015 December, **43**(4): 286-289
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2015.43.4.286
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

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

Received August 4, 2015
Revised September 10, 2015
Accepted November 30, 2015

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.

는 제주도를 제외한 전국 8개 시도 100여 개의 포장에서 뿌리혹을 채집하여 일부를 실험에 사용하였다. 수집한 뿌리혹은 다음 실험을 위해 -70°C에 보관하였다.

뿌리혹 저장조건

지금까지 사용되어온 저장방법을 개선하기 위해 최적의 저장조건을 알아보고자 다양한 조건과 온도에 뿌리혹을 저장하고 그 병원성의 지속여부를 확인하였다.

먼저 저장조건으로는 뿌리혹을 그대로 저장하는 것(Condition 1), Homogenizer로 마쇄한 것(Condition 2), 마쇄한 뿌리혹을 8겹의 거즈에 거른 것(Condition 3), 마쇄한 뿌리혹을 8겹의 거즈에 거른 것에 20% glycerol 첨가(Condition 4), Condition 3에 건전한 배추 마쇄한 것(Condition 5)을 각각 처리하고 역시 Condition 3에 20% glycerol과 건전 배추를 마쇄한 것을 같이 처리한 것(Condition 6)으로 정하였다(Fig. 1). 온도조건은 -70°C에서 보관된 뿌리혹을 가지고 -70°C, -20°C, 4°C, 25°C 4개로 구분하여 뿌리혹 상태로 저장하였다.

병원성을 확인하기 위해서 처리별로 저장 후 3개월 단위로 휴면포자를 모아 접종실험을 진행하였다. 병원성 지속여부 검정을 위해 10일 정도 기른 감수성 품종[5]인 춘정유묘(Woori Seed, Sejong, Korea)에 각각 조건별, 온도별로 현탁액 관주 접종[6]하여 25 ± 5°C의 온실에서 8주간 키운 후 혹의 형성 유무를 통해 병원성 지속여부를 확인하였다. 그리고 Choi [5]의 방법에 따라 등급을 나누고 발병도(disease severity)는 Jang [7]과 Fähling 등[8]의 방법을 이용하여 수식화하였다.

효율적인 뿌리혹 저장 조건

현재 뿌리혹병 연구자들이 흔히 사용하는 뿌리혹 저장방법은 약 140년 전에 Woronin이 고안했던 방법이다. 이 방법은 뿌리혹을 그대로 -20°C에 저장하는 것으로 단지 오래 전부터 사용되었다는 이유만으로 검증과정 없이 사용되어 왔다[9].

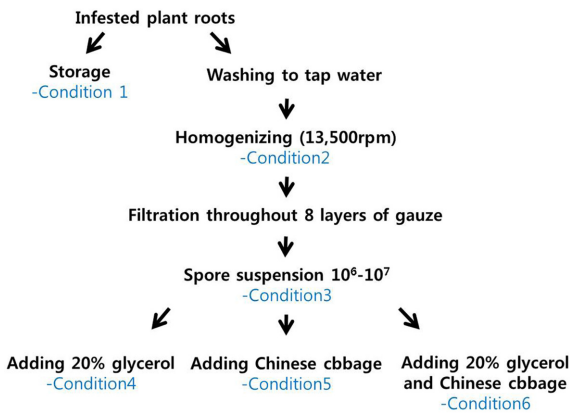

Fig. 1. Schematic diagram of clubroot gall storage conditions tested in this research to find optimal storage condition.

6가지의 저장 조건과 4가지의 온도 조건으로 총 24개의 조건하에서 뿌리혹을 저장하였고, 3개월마다 조건별로 저장된 뿌리혹을 멸균수와 같이 마쇄한 10^6~10^7 spores/mL의 휴면포자 현탁액을 10 mL씩 감수성 품종에 접종하고 품종에서의 발병 여부로 병원성을 검정하였다[10].

Kim 등[11]의 연구에 의하면 배추 뿌리혹의 부패에 미치는 요인 중 다른 환경요인보다 온도가 가장 중요한 환경요인으로 생각되며 온도가 낮을수록 다른 환경요인의 효과가 상대적으로 커진다고 보고하였다. 이 논문과 유사하게 4°C와 25°C에서 저장하였을 때, 조건에 따른 병원성의 차이는 크지 않은데 반해 -70°C에 저장하였을 때는 저장한 조건간의 차이가 확연히 다른 것을 알 수 있었다.

그 결과 -70°C에서 저장한 뿌리혹이 가장 오래 병원성을 유지하는 것을 확인하였으며 Duncan의 다중검정 결과에서도 유의성 있게 나타났다(Figs. 2, 3). -20°C에서 저장하는 것 역시 상대적으로 좋은 효과를 보았으나 -70°C와 비교하였을 때 저장 후 병원성이 감소하였고 특히 12개월이 지나서는 발병률이 평균 51.7%에 그쳤다. 4°C에서는 뿌리혹 저장 3개월 후까지는 높은 발병률을 나타내다가 그 이후는 급격하게 발병률이 낮아지는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 3개월까지는 뿌리 내에서는 활발하게 생존하지만 이후 뿌리가 부패함으로 인해 저해 받은 것으로 판단된다.

통계분석시 유의차는 없었지만, -70°C에서 저장한 6가지 저장법 중에서는 뿌리혹을 그대로 저장하는 것과 뿌리혹을 갈아 균질화한 후 8겹의 거즈로 거른 것이 가장 오래 병

Fig. 2. Test for effectiveness of storage conditions invented in this study. The resting spore suspension filtered from homogenized clubroot gall was used as a material for the test. The resting spore suspension was stored under specified temperature for certain period and stored under designed conditions were used as an inoculum to test its pathogenicity maintenance (A, stored at -70°C; B, stored at -20°C, after 21 months, respectively).

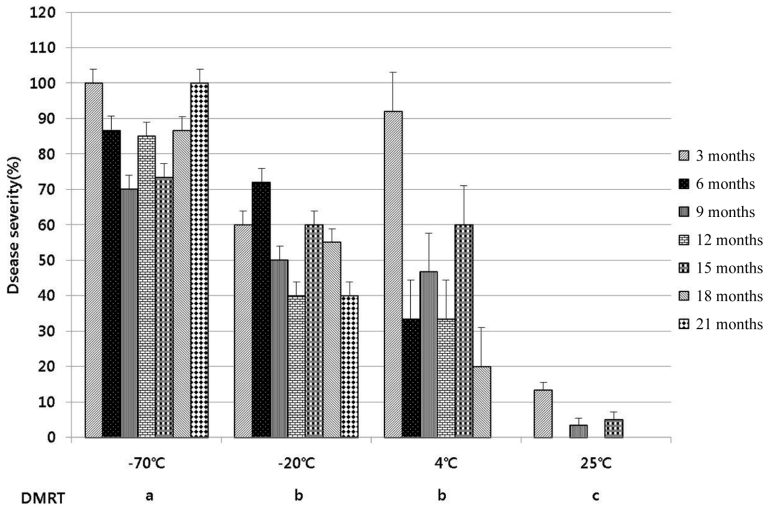

Fig. 3. Comparison of disease severity difference of the clubroot gall defending on storage temperature conditions (whole gall). Values followed by the same letter do not differ significantly at $p > 0.05$ according to Duncan's multiple range test (DMRT).

원성을 유지하였다(Fig. 4). -20°C 저장에서는 뿌리혹을 균질화하여 8겹의 거즈에 거른 것이 효과적이었다(데이터 미제시).

Devos 등[12]은 병원균이 2차 감염 과정을 거치지 않으면 뿌리혹병 특유의 병징을 확인할 수 없다고 하였고, Feng 등[13]의 연구에서는 배추 삼출물이 존재할 때 삼출물이 없을 때보다 뿌리혹병균의 휴면포자가 유주자로 발아가 많이 이루어진다고 보고하였다. 이는 2차 감염과 밀접한 관계가 있는 유주자의 발아에 배추의 삼출물이 영향을 미친다고 유추할 수 있다.

2차 감염을 하는 유주자의 발아에 영향을 주는 배추 삼출물이 혹을 균질화하면서 배추 세포 내에 있던 휴면포자가

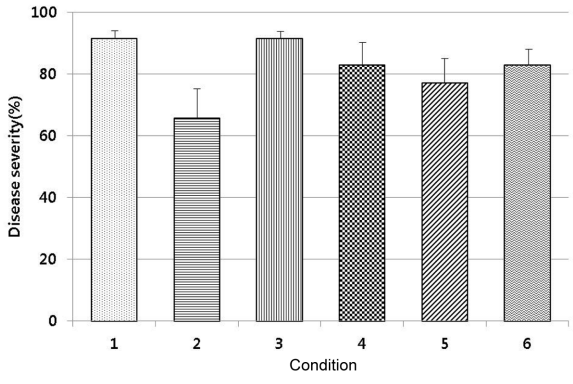

Fig. 4. Difference in disease severity defending on storage condition when the clubroot stored at -70°C after 21 months storage. 1, Whole gall; 2, Homogenizing; 3, Homogenizing and filtration with 8 layers of gauze; 4, Condition 3 + adding 20% glycerol; 5, Condition 3 + adding homogenized disease free kimchi cabbage root; 6, Condition 3 + adding 20% glycerol + homogenized disease free kimchi cabbage root.

밖으로 드러나면서 배추 삼출물 역시 병원균과 함께 존재하고 그 영향으로 휴면포자가 많이 발아하게 되고, 이후 발아한 유주자는 굉장히 약한 상태로 외부자극에 의해 생리, 생장 기능 등에 영향을 받아 죽거나 병원성에 영향을 주었을 것으로 판단된다. 또한 뿌리혹을 갈고 균질화한 것을 현미경으로 관찰하면 휴면포자가 작게 균질화된 식물체 조직에 밀접하게 붙어있는 것을 볼 수 있었는데, 이것이 인위적으로 배추조직 마쇄한 것을 넣어주는 것보다 장기간 저장하는데 더 효과적임을 확인할 수 있었다.

배추뿌리혹병에 걸린 배추는 토양세균의 2차 침입을 받아 썩어 결국은 식물체 전체가 죽게 되는데, 감염된 세균이 뿌리혹을 저장할 때도 뿌리혹을 부패시킨다. 이 결과를 통해 같은 병원균이나 뿌리혹이라도 -70°C에서 배추의 삼출물의 영향이 최소화된 상태로 저장하면 좀 더 병원균의 특징이나 상태의 변화가 최소화된 상태에서 보다 정밀하고 정확한 연구를 오래 지속할 수 있을 것이라고 기대한다.

적 요

순활물기생체인 *Plasmodiophora brassicae*는 병원성 검정을 위해서 반드시 뿌리혹을 장기적으로 보관하는 것이 매우 중요하기 때문에 그동안 병원성을 유지하는 것이 관건이다. 특히 기존의 방법은 100년 이상 사용되어온 저장법으로 개선이 필요하여 그 효율적인 방법을 밝히고자 하였다. 이 결과 장기적으로 병원성의 저하를 최소화하며 장기간 뿌리혹을 저장할 수 있는 방법은 -70°C 냉동고에 보관하는 것으로 확인되었고, 저장 조건은 뿌리혹을 그대로 보관하거나 뿌리혹을 갈아 균질화한 후 여러 겹의 거즈에 거른 것이 6가지 저장조건 중에 가장 효과적인 저장법으로 밝혀졌다.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Golden Seed Project (Grant No. 213002043SBI40) of the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA), Republic of Korea.

REFERENCES

1. Kageyama K, Asano T. Life cycle of *Plasmodiophora brassicae*. J Plant Growth Regul 2009;28:203-11.
2. Wallenhammar AC. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. Plant Pathol 1996; 45:710-9.
3. Ludwig-Müller J. *Plasmodiophora brassicae*, the causal agent of clubroot disease: a review on molecular and biochemical events in pathogenesis. J Plant Dis Prot 1999;106:109-27.
4. Voorrips RE, Kanne HJ. Genetic analysis of resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in *Brassica oleracea*. II. Quantitative analysis of root symptom measurements. Euphytica 1997;93:41-8.
5. Choi JS. Utilization of species-specific primers and establishment of novel isolation, mass-propagation method for single spore isolates of *Plasmodiophora brassicae*, Chinese cabbage clubroot pathogen [dissertation]. Daejeon: Chungnam National University; 2010.
6. Jo SJ, Jang KS, Choi YH, Kim JC, Choi GJ. Convenient screening method of Chinese cabbage for resistance to *Plasmodiophora brassicae* using soil-drenching inoculation. Res Plant Dis 2010;16:279-84.
7. Jang SJ. Characteristics of infection and novel single-spore isolation method through two-step inoculation of clubroot pathogen, *Plasmodiophora brassicae* [dissertation]. Daejeon: Chungnam National University; 2006.
8. Fähling M, Graf H, Siemens J. Characterization of a single-spore isolate population of *Plasmodiophora brassicae* resulting from a single club. J Phytopathol 2004;152:438-44.
9. Sharma K, Gossen BD, McDonald MR. Effect of temperature on cortical infection by *Plasmodiophora brassicae* and clubroot severity. Phytopathology 2011;101:1424-32.
10. Yang SG. Study on Korean *Plasmodiophora brassicae* characteristics, occurrence of a new race and optimal storage condition for clubroot [dissertation]. Daejeon: Chungnam National University; 2012.
11. Kim CH, Cho WD, Kim HM. Some environmental factors affecting decay of root galls in clubroot disease of Chinese cabbage. Korean J Pestic Sci 2000;4:61-5.
12. Devos S, Vissenberg K, Verbelen JP, Prinsen E. Infection of Chinese cabbage by *Plasmodiophora brassicae* leads to a stimulation of plant growth: impacts on cell wall metabolism and hormone balance. New Phytol 2005;166:241-50.
13. Feng J, Hwang R, Hwang SF, Strelkov SE, Gossen BD, Zhou QX, Peng G. Molecular characterization of a serine protease Pro1 from *Plasmodiophora brassicae* that stimulates resting spore germination. Mol Plant Pathol 2010;11:503-12.