

RESEARCH ARTICLE

작약에서 분리한 *Cylindrocarpon destructans*의 인삼에 대한 병원성 검정 및 분류학적 고찰

서문원^{1,2}, 송정영¹, 강광훈¹, 박수연¹, 김선익³, 김홍기^{1*}

¹충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과, ²국립원예특작과학원 인삼특작부,
³충청남도농업기술원 인삼약초연구소

Virulence Assays and Genetic Reclassification to Assess the Pathogenicity of *Cylindrocarpon destructans* Isolated from Peony in Ginseng

Mun Won Seo^{1,2}, Jeong Young Song¹, Kwang Hoon Kang¹, Soo Yeon Park¹, Sun Ick Kim²,
Hong Gi Kim^{1*}

¹Department of Applied Biology, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

²Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural and Herbal Science,
Eumseong 27709, Korea

³Geumsan Ginseng and Medicinal Crop Experiment Station, Chungcheongnam-do Agricultural
Research and Extension Services, Geumsan 32713, Korea

*Corresponding author: hgkim@cnu.ac.kr

Abstract

To obtain useful data on root rot in Korean ginseng, we performed phylogenetic analysis and pathogenicity test for *Cylindrocarpon destructans* isolated from peony. *Cylindrocarpon destructans* isolates from peony were proven to cause ginseng root rot. The isolate KACC44663 was identified as *Ilyonectria robusta* under the new classification system, which belongs to the *I. radicola* species complex. This is the first report of the pathogenic isolate, which was isolated from another host plant, but not ginseng, that can cause root rot disease on ginseng in Korea.

Keywords: *Cylindrocarpon destructans*, Ginseng, *Ilyonectria robusta*, Pathogenicity, Peony

서론

인삼 뿌리썩음병균인 *Cylindrocarpon destructans*는 삼나무 등의 뿌리 부패와 마름병[1], 감자, 당근의 저장병[2], 연, 양파, 시크라멘, 작약, 크로버의 뿌리 부패를 일으키며[3], 식물 및 수목의 근권과 근면에도 부생적으로 흔하게 존재하는 균으로 알려져 있으며[4-7], 국내에서는 인삼 이외에 작약, 딸기에서의 발생이 보고된 바 있다[8].

Matuo와 Miyazawa [1]는 삼나무에서 분리한 *C. destructans*의 인삼에 대한 병원성 실험

OPEN ACCESS

Kor. J. Mycol. 2017 June, 45(2): 132-138
<https://doi.org/10.4489/KJM.20170016>

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Received: 11 April, 2017

Revised: 29 May, 2017

Accepted: 29 May, 2017

© The Korean Society of Mycology



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

에서 병원성이 없거나 약병원성을 보였지만, 인삼 분리균주들은 인삼에 대하여 강한 병원성을 보였고, 인삼 이외의 다른 작물에는 병원성을 나타내지 않아 인삼에서 분리한 균을 새로운 분화형으로 *C. destructans* f. sp. *panacis*로 명명한 바 있다. 그러나 작약에서 분리된 *C. destructans*는 인삼의 뿌리썩음병과 유사한 검은뿌리썩음병을 일으켜 인삼의 경우처럼 작약에 연작 장애를 일으키기 쉽고 다범성임에도 인삼에 대한 병원성은 밝혀진 바 없고 새로운 분류체계에 의한 재분류도 이루어진 바 없다[9].

최근에 Cabral 등 [10]은 internal transcribed spacer (ITS) region, b (*beta*)-tubulin, translation elongation factor 1- α , histone h3 유전자 등의 염기서열을 이용한 multi-locus 분석과 형태학적 특성을 비교하여 *Cylindrocarpon* (*Nectria*/*Neonectria*) species complex를 *Ilyonectria radicola* species complex로 명명하고 complex 내에 존재하는 clade a와 b를 총 17개의 종으로 재분류하였으며, 인삼으로부터 분리된 *I. mors-panacis*, *I. robusta*, *I. panacis*, *I. crassa* 등 모두 4종이 재정립되었다.

본 연구는 작약에 검은뿌리썩음병을 야기하는 *C. destructans*가 새로운 분류체계에 의해 재분류하여 인삼으로부터 분리된 종들과의 관련성을 분석하고, 작약 분리균의 인삼에 대한 병원성을 확인하여 인삼에서 뿌리썩음병의 발생 가능성을 밝혔다.

재료 및 방법

공시균주

본 연구에서 사용된 *Cylindrocarpon destructans* 작약 분리균주(KACC44663)는 경북 의성군의 작약의 뿌리로부터 2004년에 분리한 균으로 국립농업과학원 농업유전자원센터에서 분양받아 사용하였으며, 인삼분리균 CY8051, CY8061은 전형적으로 뿌리썩음병 증상을 보인 인삼으로부터 분리하였다.

채집된 인삼 병반 조직을 흐르는 물에 수세한 후, 건전 부위와 부패 부위의 조직을 1 cm 크기로 절단, 2% NaOCl에 1분간 침지하여 표면 소독하였고, 멸균수로 2~3회 세척한 다음 여과지로 수분을 제거하였다. 표면 소독된 병든 조직을 water agar 또는 pentachloronitrobenzene agar (PCNBA) 배지에 올려놓고, 15°C에서 7일간 배양하였다. 배양된 조직에서 자라 나온 균사 중 단균사를 떼어 potato dextrose agar (PDA) 배지에 재분리하였고, 이것을 15°C에서 10일간 배양 후 단포자 분리하여 암조건 하에 15°C에서 배양, 보관하며 추가적인 실험에 이용하였다.

병원성 조사

실내 접종

인삼뿐만 아니라 작약에서 분리된 *C. destructans* 균주들의 인삼에 대한 병원성을 조사하기 위하여 2% NaOCl로 표면 소독된 2년근 인삼을 준비하였으며 접종원으로 각 균주들을 PDA 배지에 접종 후 20°C에서 14일간 배양하여 사용하였다. 접종때 사용한 플라스틱 박스는 70% 에탄올로 소독한 다음 멸균수로 적신 티슈를 깔고 배양된 균사를 cork borer (직경 5 mm)로 떼어내어 인삼 표면에 올려놓은 후 tip을 이용하여 인삼에 상처를 내고 고정시켰다. 그 후

플라스틱 박스 안에 넣어 20°C 항온기에서 4주간 치상한 다음 이병 정도를 관찰하였다[11].

실외 검정

실외 병원성 검정 역시 인삼과 작약에서 분리된 *C. destructans* 균주의 인삼에 대한 병원성 유무 및 그 차이를 묘삼에서 조사하였다. 접종원은 PDA 배지에 20°C에서 14일간 배양하여 사용하였다. 배양된 균사조직을 멸균수 40 mL와 함께 마쇄하여 균사현탁액을 만든 후, 묘삼을 침지시킨 후 충남 금산에 위치한 인삼약초연구소의 예정지 관리가 된 연구 포장에서 2013년 5월경 이식하고 3년 후 이병 정도를 확인하였다.

DNA 분리

C. destructans 공시균주들을 순수배양한 다음 genomic DNA를 분리하기 위해 potato dextrose broth (PDB) 배지에 접종하여 20°C에서 정치 배양하였다. 균사를 수확하여 1.5 mL eppendorf tube에 넣고 동결건조시켜 마쇄한 후, Doyle [12]의 방법을 적용하여 DNA를 추출하였다.

염기서열을 이용한 유연관계 분석

병원균의 염기서열 분석을 통한 종 동정을 위하여 진핵세포의 chromatin 구조에 관여하는 histone h3 영역으로부터 제작된 CYLH3F와 CYLH3R primer를 이용하여 annealing 온도 62°C, 35 cycles로 PCR을 수행하였다[13].

각 primer 0.5 pmol, 2 ng의 genomic DNA, 0.2 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCL, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 unit의 Taq DNA polymerase에 멸균수를 첨가하여, 최종 volume을 50 µL로 하였다.

증폭된 PCR 산물은 Macrogen (Seoul, Korea)에 염기서열분석을 의뢰한 후, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)을 이용하여 염기서열을 비교하였다.

또한 유연관계 분석을 위한 염기서열은 MEGA6 software를 이용하여 정렬하였고 불분명하게 정렬된 부분은 분석에서 제외하고 작성하였다. 1,000회의 bootstrap 분석을 통해 신뢰도를 평가하였으며, Cabral 등 [10]에 의해 재정립된 *I. radicola* species complex 내 종들의 염기서열이 함께 분석되었다.

결과 및 고찰

작약 분리균의 인삼에 대한 병원성

작약으로부터 분리된 *C. destructans* 균주의 인삼에 대한 병원성 검정을 실시하였다. 실험실 상에서 상처 접종 결과, 인삼에서 분리된 *C. destructans* CY8051은 11.3 mm로 빠르고 넓게 병반이 퍼졌으며, 작약에서 분리된 *C. destructans* KACC44663은 4.3 mm로 진전되었다. 두 균주 모두 병원성을 확인할 수 있었다(Table 1).

Table 1. The pathogenicity on roots of ginseng by each *Cylindrocarpon destructans* isolated from Korean ginseng and peony

Isolate	Pathogen	Host plant	Average of lesion length (mm)
CY8051	<i>Ilyonectria mors-panacis</i>	Korean ginseng	11.3
CY8061	<i>Ilyonectria robusta</i>	Korean ginseng	5.3
KACC 44663	<i>I. robusta</i>	peony	4.3
N. C	-	-	0.8

N.C, negative control; —, No infection

작약에서 분리된 *C. destructans* KACC44663 균주가 인삼에 직접 병을 낼 수 있는지 확인하기 위해서 실외 검정을 실시하였다. 인삼에서 분리되었던 균주 중 *C. destructans* CY8051은 실내 검정 결과와 동일하게 가장 병원성이 강했으며, 작약에서 분리된 *C. destructans* KACC44663은 인삼분리균인 *C. destructans* CY8061과 유사하게 인삼에 대해 약한 병원성이 확인되었다(Table 2, Fig. 1).

국내에 알려진 *C. destructans*의 기주로는 인삼 이외에 작약, 딸기만이 보고되었다[8]. 특히 인삼과 마찬가지로 뿌리를 이용하는 작약에서 분리된 균주의 인삼에 대한 병원성이 밝혀진 바는 없었다. 본 연구를 통해 작약에서 분리된 *C. destructans*가 작약 외에 인삼에도 병을 일으킬 수 있음이 최초로 확인되었다.

Table 2. The pathogenicity on roots of ginseng by each *Cylindrocarpon destructans* isolated from Korean ginseng and peony

Isolate	Pathogen	Host plant	Disease severity (%) ^a	
CY8051	<i>Ilyonectria mors-panacis</i>	Korean ginseng	100	++++
CY8061	<i>Ilyonectria robusta</i>	Korean ginseng	22.6	+++
KACC 44663	<i>I. robusta</i>	peony	23.8	+++

^a+, 1~10%; ++, 11~20%; +++, 21~30%; +++, 30%.



Fig. 1. Root rot symptoms on field-grown ginseng plants by *Ilyonectria radicola* species complex (*Cylindrocarpon destructans*) with high (CY8051; *Ilyonectria mors-panacis*) and weak pathogenicity (CY8061, KACC44663; *Ilyonectria robusta*).

유연관계 분석을 통한 작약 분리군의 재분류

새로운 분류체계를 토대로 앞서 *C. destructans*로 동정된 작약 분리군의 계통학적 분석을 실시한 결과, 이 병원균은 *Ilyonectria radicola* species complex 내에 포함되는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 국내 인삼 뿌리썩음병균으로부터 분리된 CY8051, CY8061도 같은 complex를 이루었으며, 작약 분리군(KACC44663)은 CY8061과 동일한 *I. robusta*로 동정되었다.

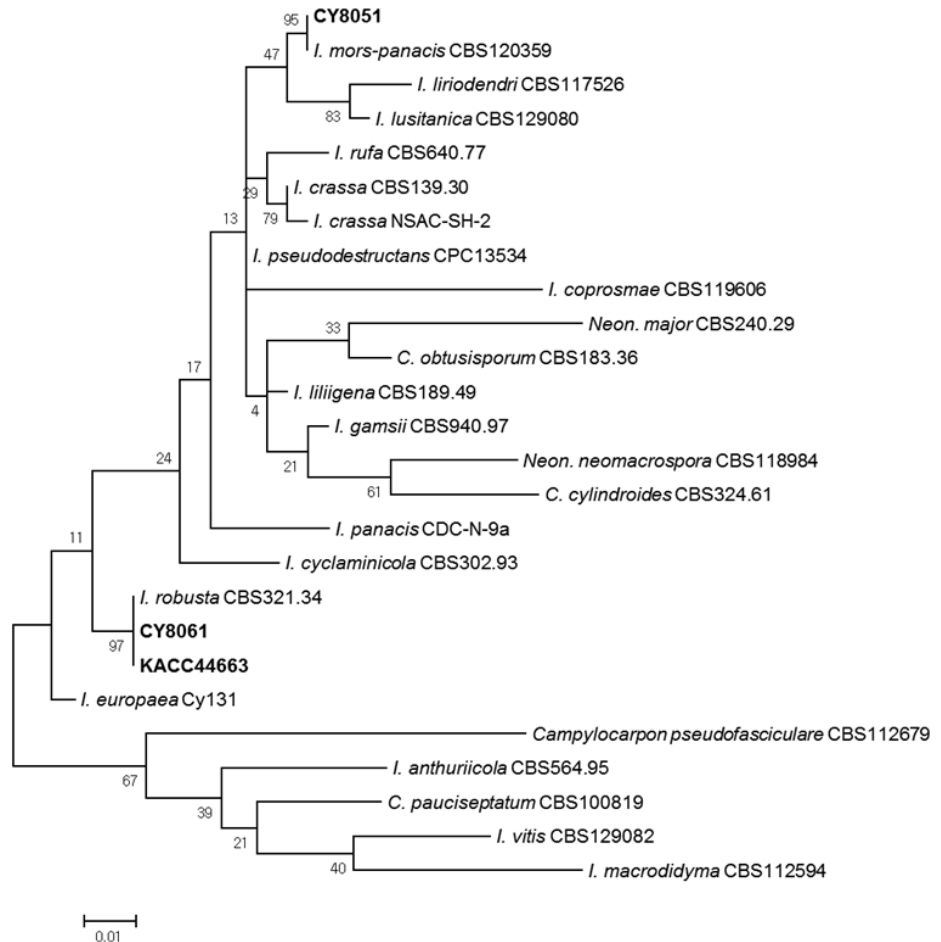


Fig. 2. Phylogenetic analysis of *Ilyonectria* species isolated from Korean ginseng and peony based on the histone H3 gene sequences. The bootstrap analysis was performed with 1,000 replications.

외국에서는 인삼 뿌리썩음병균으로 *I. mors-panacis*, *I. robusta*, *I. panacis*, *I. crassa* 등 모두 4 종이 밝혀진 바 있다[10]. 한편 국내에서는 Chung [14]에 의해 최초로 인삼뿌리에서 *C. destructans*의 발생이 보고된 이후로, Seo 등 [15]은 RAPD 분석에 의해 국내 인삼뿌리썩음병균 집단의 유전적 다양성을 확인했으며, Song 등 [16]은 ITS 영역, mitochondrial small subunit (mt SSU) rDNA의 염기서열을 이용하여 국내 인삼뿌리썩음병균 집단이 외국의 인삼뿐만 아니라 타기주로부터 분리된 *C. destructans*와 같은 complex를 이루는 것을 확인하

였다.

또한 Carbral 등 [10]이 *Ilyonectria*속 내 종 분류에 사용된 균들의 기주는 *I. mors-panacis*의 경우 오직 인삼(*Panax ginseng*, *P. quinquefolium*) 뿐이었으며, *I. robusta*는 미국삼, 피나무, 참나무류, *Thymus* sp., 포도나무 등이었다.

본 연구는 기존에 *C. destructans*로 동정된 작약 분리균에 대한 분자계통학적 분석을 처음으로 시도하였으며, 작약 분리균이 국내 인삼뿌리썩음병균(CY8061)과 일치하는 것으로 보아 인삼뿌리썩음병을 일으킬 가능성이 있는 것으로 판단되었다.

적 요

작약에서 분리된 *Cylindrocarpon destructans* KACC44663 균주의 인삼에 대한 병원성 여부를 밝혀내고자 병원성 검정을 실시하였고 새로운 분류체계에 따른 균의 재분류를 위해 계통학적 유연관계를 분석하였다. 작약으로부터 분리된 KACC44663 균주가 인삼에 병을 일으키는 것을 확인하였고, 새로운 분류체계에 의해 *I. radicola* species complex 내 위치하는 *Ilyonectria robusta*로 동정하였다. 이는 국내에서 타 기주로부터 분리된 병원균이 인삼에 뿌리썩음병을 일으키는 것을 증명한 첫 사례이다.

Acknowledgements

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

REFERENCES

1. Matuo T, Miyazawa Y. Scientific name of *Cylindrocarpon* spp. causing root rot of ginseng. Ann Phytopathol Soc Japan 1984;50:649-52.
2. Booth C. The genus *Cylindrocarpon*. Mycol Pap 1966;104:1-56.
3. Domsch KH, Gams W, Anderson TH. Compendium of soil fungi. London: Academic Press; 1980.
4. Creelman DW. Summary of the prevalence of plant disease in Canada in 1961. Can Plant Dis Surv 1962;42:23-102.
5. Singleton LL, Mihail JD, Rush CM. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. St. Paul: APS Press; 1992.
6. Punja ZK. Fungal pathogens of American ginseng (*Panax quinquefolius*) in British Columbia. Can J Plant Pathol 1997;19:301-6.
7. Reeleder RD, Roy R, Capell B. Seed and root rots of ginseng (*Panax quinquefolius* L) caused by *Cylindrocarpon destructans* and *Fusarium* spp. J Ginseng Res 2002;26:151-8.
8. The Korean Society of Plant Pathology. List of plant diseases in Korea. 5th ed. Seoul: Korean Society of Plant Pathology; 2009.
9. Choi SY, Park KS, Kim KJ, Kim JC. Occurrence and control of black root rot of peony (*Paeonia lactiflora*) on continuous cropping. Res Plant Dis 2004;10:268-71.
10. Cabral A, Groenewald JZ, Rego C, Oliveira H, Crous PW. *Cylindrocarpon* root rot:

- multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicicola* species complex. Mycol Prog 2012;11:655-88.
11. Seo MW. Analysis of characteristics for Korean ginseng root rot pathogen (*Cylindrocarpon destructans*) and development of new diagnostic molecular marker [dissertation]. Daejeon: Chungnam National University; 2009.
 12. Doyle JJ. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 1990;12:13-5.
 13. Crous PW, Groenewald JZ, Risede JM, Simoneau P, Hywel-Jones NL. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. Stud Mycol 2004;50:415-30.
 14. Chung HS. Ginseng disease. In: Research reports of the Korean Society of Plant Protection. Seoul: Korean Society of Plant Protection; 1979. p. 107-44.
 15. Seo MW, Kim SI, Song JY, Kim HG. Genetic diversity of Korean *Cylindrocarpon destructans* based on virulence assay and RAPD analysis. Kor J Mycol 2011;39:16-21.
 16. Song JY, Seo MW, Kim SI, Nam MH, Lim HS, Kim HG. Genetic diversity and pathogenicity of *Cylindrocarpon destructans* isolates obtained from Korean *Panax ginseng*. Mycobiology 2014;42:174-80.