

## 식물병원 진균 균주의 살균증류수 저장법

이종규\* · 최경자 · 김병섭 · 조광연  
한국화학연구소 스크리닝 안전성연구센터

### Storage of Phytopathogenic Fungal Cultures in Sterile Distilled Water

Jong Kyu Lee\*, Kyung Ja Choi, Byung Sup Kim and Kwang Yun Cho  
Screening & Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology,  
Yusong, P.O.Box 107, Taejeon 305-606, Korea

**ABSTRACT:** About 450 phytopathogenic fungal cultures were stored in sterile distilled water at room temperature by the sterile water storage method, which has been known as a simple, convenient, and long-term storage method of microorganisms. After 12 months, viability and pathogenicity of the stored isolates were tested. Among 205 isolates tested, 175 isolates (84.5%) survived. Of these, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Pyricularia oryzae*, *Phytophthora infestans*, and *Sclerotinia sclerotiorum* showed relatively lower survival rate; 92%, 74.1%, 62.5%, 45.8%, and 30%, respectively. Twenty seven isolates belonging to seven important phytopathogenic fungi were tested for pathogenicity, and all isolates tested maintained pathogenicity until at least 12 months after storage.

**Key words:** Sterile water storage, viability, maintenance of pathogenicity, phytopathogenic fungi.

일반적으로 식물병리학을 포함하여 미생물학에 관련된 여러 분야의 연구를 수행하는 대학이나 연구소의 실험실에서는 다양한 종류의 미생물 균주를 확보, 유지하며 각종 실험에 사용하고 있는데 이들 균주의 특성을 변화없이 계속적으로 유지시키기 위하여는 신선한 배지에 주기적으로 이식하여 주어야 한다. 이 작업은 균주의 숫자가 많아지게 되면 많은 시간과 노동력이 요구되며, 특히 병원균주인 경우에는 여러번 이식해서 사용하다보면 병원성 또는 포자형성력을 상실하는 경우도 발생한다. 균주의 이식 주기는 저장온도와 습도에 관련이 있지만 일반적으로 3~5°C의 냉장상태에서 보관시 6~8주마다 새로운 배지로 옮겨주어야 한다. 이러한 이식 작업의 번거로움을 피하기 위하여 오랜 기간동안 균주를 저장할 수 있는 방법들이 개발되어 왔는데 이들은 mineral oil법, 건조법, 살균증류수 저장법, 냉동저장법, 실리카겔 저장법, 액화질소 저장법, 동결건조법 등이 있으며, 균주의 종류와 특성 및 각 방법의 장단점에 따라서 적절한 방법을 선택하여 사용하고

있다(3, 6, 8).

이들 중에서 살균증류수 저장법은 여러 보고에서 미생물 균주의 보관 및 저장이 대체로 간편한 방법으로 알려져 있지만 식물병원 균주에 대해서 생존율 및 병원성 유지를 조사한 보고는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 실험에서는 다양한 종류의 식물 병원균주를 살균증류수에 저장하고 일정 기간이 지난 후에 각 균주들의 생존율 뿐만 아니라 병리학적 관점에서 중요한 병원성의 유지유무를 조사하였다.

한국화학연구소 스크리닝 안전성연구센터 살균제 연구실에서 보관하고 있는 약 450여 종류의 식물 병원균주를 다음과 같이 저장 및 보관하였다. 각 균주를 신선한 감자한천배지상에서 25°C로 배양한 후 살균한 7 mm cork borer를 이용하여 균총의 가장자리에서 각 균주당 5개씩의 agar culture disc를 떼어내어 증류수를 70% 정도로 채워서 살균한 Nunc cryotube® (1.8 ml)에 넣고 두껍을 돌려서 닫은 후 parafilm으로 봉하였다. 각 균주는 고유번호를 부여하여 저장박스내의 지정된 위치에 저장한 후 실온에 보관하였다(Fig. 1).

살균증류수에 저장되어 있는 균주들의 생존율을

\*Corresponding author.

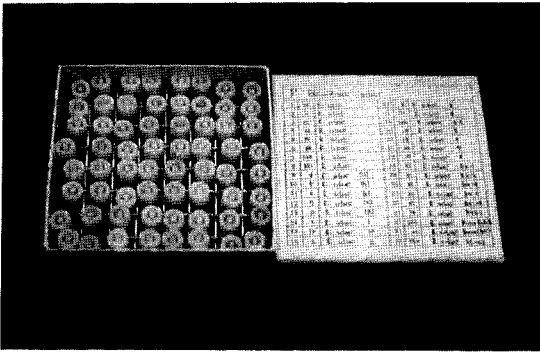


Fig. 1. Fungal cultures stored at Nunc cryotubes® in a storage box.

조사하기 위하여 중요한 식물병원균주들의 agar culture disc를 12개월 후에 저장 튜브에서 꺼내어 신선한 감자한천배지 또는 V-8 juice agar 배지에 올려 놓고 20~25°C 정도에서 배양하면서 균사가 발육하며 성장하는지를 관찰하였다. 조사한 21속 32종의 균주중에서 17속 26종에 속하는 균주들은 모두 균사가 발육하며 성장을 하여 100%의 생존율을 보인 반면에, *Rhizoctonia solani*는 92%, *Botrytis cinerea*는 74.1%, *Pyricularia oryzae*는 62.5%, *Phytophthora infestans*는 45.8%, *Sclerotinia sclerotiorum*은 30%, *Sclerotinia* sp.는 75%의 생존율을 나타내었다. 즉, 생존율을 조사한 총 205균주 중에서 175균주가 생존하여 평균 85.4%의 생존율을 나타내었다(Table 1).

살균증류수에 12개월 동안 저장보관한 식물병원균주들이 병원성을 계속 유지하는지를 확인하기 위하여 생존이 확인된 균주들 중에서 주요한 식물병원균인 고추 탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides*), 벼 키다리병균(*Fusarium moniliforme*), 무우 시들음병균(*Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani*), 고추 역병균(*Phytophthora capsici*), 벼 도열병균(*Pyricularia oryzae*), 모잘록병균(*Pythium* sp.), 벼 잎집무늬마름병균(*Rhizoctonia solani*) 등을 선정하여 각 기주 식물체에 대한 병원성을 검정하였다.

고추 탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides*)은 온실에서 재배하여 수확한 약 5 cm 크기의 푸른 고추 열매(품종: 일월)에 침으로 상처를 낸 후, PDA 배지상에서 10일간 배양된 균총의 가장자리로부터 agar disc(직경 5 mm)를 떼어내어 그 위에 놓고 25°C에서 10일간 습실처리하여 발병유무를 조사하였다. 벼 키다리병균(*Fusarium moniliforme*)과 무우 시들음병균(*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*)은 각 균주를 감자즙액배지에 이식하여 25°C에서 7일 동안 진탕

Table 1. Survival rate of phytopathogenic fungal isolates stored in sterile distilled water for 12 months at room temperature

Isolates	No. of isolates tested	No. of isolates survived	Survival rate (%)
<i>Alternaria alternata</i>	10	10	100
<i>Alternaria dianthi</i>	2	2	100
<i>Alternaria porri</i>	2	2	100
<i>Alternaria solani</i>	2	2	100
<i>Bipolaris maydis</i>	1	1	100
<i>Botrytis cinerea</i>	27	20	74.1
<i>Cladosporium(Fulvia) fulvum</i>	3	3	100
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	2	2	100
<i>Cochliobolus sativus</i>	1	1	100
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	16	16	100
<i>Colletotrichum</i> sp.	5	5	100
<i>Corynespora cassicola</i>	3	3	100
<i>Curvularia</i> sp.	4	4	100
<i>Dothiorella mali</i>	1	1	100
<i>Fusarium oxysporum</i>	19	19	100
<i>Fusarium moniliforme</i>	3	3	100
<i>Mycosphaerella</i> sp.	2	2	100
<i>Nectria</i> sp.	2	2	100
<i>Phytophthora cactorum</i>	1	1	100
<i>Phytophthora capsici</i>	5	5	100
<i>Phytophthora infestans</i>	24	11	45.8
<i>Phytophthora nicotianae</i>	1	1	100
<i>Pyricularia oryzae</i>	16	10	62.5
<i>Pythium</i> sp.	5	5	100
<i>Pythium ultimum</i>	2	2	100
<i>Rhizoctonia solani</i>	25	23	92
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	10	3	30
<i>Sclerotinia</i> sp.	4	3	75
<i>Stromatinia gladioli</i>	1	1	100
<i>Thielaviopsis basicola</i>	1	1	100
<i>Trichoderma</i> sp.	5	5	100
<i>Verticillium dahliae</i>	2	2	100
Total isolates	205	175	85.4

배양한 후 cheese cloth로 균사를 제거시킨 포자현탁액을 접종원으로 이용하였다. 벼 키다리병균의 검정은 최아시킨 벼 종자(품종: 낙동)를 접종원에 24시간 침지시킨 후 논토양에 이식하여 온실에서 재배하면서 발병유무를 관찰하였으며, 무우 시들음병균은 뿌리에 상처를 낸 3엽기 무우 묘묘(품종: 궁중총태)를 접종원에 24시간 침지한 후 토양에 이식하여 온실에서 재배하면서 3주 후에 발병유무를 조사하였다. 고추 역병균(*Phytophthora capsici*)은 V-8배지(V-8 juice 200 ml, CaCO<sub>3</sub> 4.6 g, agar 20 g, 증류수

**Table 2.** Maintenance of pathogenicity of phytopathogenic fungal isolates stored in sterile distilled water for 12 months at room temperature<sup>a</sup>

Phytopathogenic fungi	No. of isolates tested	Host plants (variety)	Plant parts used	Frequency (a/b) <sup>b</sup>
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	5	Pepper (Ilwoel)	Fruit	5/5
<i>Fusarium moniliforme</i>	3	Rice (Nakdong)	Seedling	3/3
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	5	Radish (Gungjungchongtae)	Seedling	5/5
<i>Phytophthora capsici</i>	4	Tomato (Daehyungboksu)	Seedling	4/4
		Pepper (Hongsanho)	Seedling	4/4
<i>Pyricularia oryzae</i>	3	Rice (Nakdong)	Seedling	3/3
<i>Pythium</i> sp.	2	Cucumber (Hannong baekdadaki)	Seedling	2/2
<i>Rhizoctonia solani</i>	5	Rice (Nakdong)	Seedling	5/5

<sup>a</sup>Maintenance or loss of pathogenicity was determined by the symptom production as compared with the control.

<sup>b</sup>a: Number of isolates maintained pathogenicity until 12 months after storage.

b: Number of isolates tested for pathogenicity.

800 ml)에서 형성된 유주자낭을 수확한 포자현탁액 ( $10^5$  sporangia/ml)을 2엽기 토마토(품종: 대형복수)와 4엽기 고추(품종: 홍산호)유묘가 식재된 토양에 관주접종한 후 온실에 두고 병발생을 조사하였다. 벼도열병균(*Pyricularia oryzae*)은 쌀겨배지(쌀겨 20 g, dextrose 10 g, agar 16 g, 증류수 1 l)에 병원균을 이식하여 25°C에서 14일간 배양한 후 형광등을 조사하여 형성시킨 포자를 수확하여( $10^6$  spores/ml) 3엽기 벼(품종: 낙동)에 분주접종하고 24시간 습실처리하여 25°C에서 유지하며 4일 후에 발병유무를 조사하였다. 모잘록병균(*Pythium* sp.)은 PDA배지에서 7일간 배양한 균을 blender로 갈아 1엽기 오이유묘(품종: 한농백다다기)가 식재된 폿트내의 토양 위에 부어 접종한 후 온실에 두고 발병을 조사하였다. 벼 잎집 무늬마름병균(*Rhizoctonia solani*)은 밀기울 왕겨배지(밀기울 200 ml, 왕겨 100 ml, 증류수 100 ml)에서 배양하여 증류수를 첨가한 후 고르게 갈아서 만든 slurry를 벼유묘(품종: 낙동)가 식재된 폿트내의 토양 위에 부어 접종하고 27°C에서 3일 동안 습실처리한 후 25°C에서 유지하면서 발병을 조사하였다. 이상의 7개 병원균에 속하는 27개 균주를 각 기주식물체에 접종하여 병원성 유지유무를 조사한 결과, 모든 균주들이 12개월 후에도 병원성을 유지하는 것으로 확인되었다(Table 2).

식물병원 균주를 포자형성율과 병원성 등의 유전적인 변화없이 오랜 기간 동안 보관하기에 가장 좋은 방법은 동결건조법이지만 이 방법은 고가의 장치가 필요하고 오랜 시간이 소요되므로 보다 간편하고 쉬우며 효과적인 방법으로 살균증류수 저장법이 알려져 있고, Boesewinkel(1)은 특히 주요 식물병원 진균인 *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia*

spp., *Botrytis cinerea* 등이 이 방법으로 저장하여 7년 후에 까지도 형태적인 특징의 변화없이 생존이 가능하였다고 보고하였고, Ellis는(4) 66 종류의 진균을 저장하여 5개월 후에 50균주, 8개월 후에 43균주, 20개월 후에 34균주가 생존하였다고 보고하였다. Clark와 Dick는(2) 난균류에 속하는 진균들에 대하여 이 방법을 이용하였고, Marx와 Daniel은(7) 몇 종류의 외생균과 식물병원 진균을 이 방법으로 저장하여 5°C에서 보관하였으며, 영국의 IMI(International Mycological Institute)에서도 몇 종류의 *Phytophthora* spp.와 *Pythium* spp.를 살균증류수에 보관하는 것으로 알려져 있다(3). 본 실험에서는 식물의 주요 병원진균인 *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Pythium*속에 속하는 균주들을 포함하여 조사한 균주의 85.4%에 해당하는 175균주가 12개월 후까지 생존하였다. 한편 *Phytophthora*속에 속하는 균주는 *P. cactorum*, *P. capsici*, *P. nicotianae* 등이 100%의 생존율을 보였고 *P. capsici*는 병원성을 유지하였지만 *P. infestans*는 45.8%의 낮은 생존율을 나타내었다. *Sclerotinia sclerotiorum*(30%), *Pyricularia oryzae*(62.5%), *Botrytis cinerea*(74.1%) 등도 상대적으로 낮은 생존율을 보였다. 또한 Iacobellis와 Devay는(5) 식물병원 세균인 *Agrobacterium tumefaciens*와 *Pseudomonas* spp.은 이 방법으로 각각 20, 24년동안 저장한 경우에도 90~92%의 높은 생존율을 보였고, *Ps. syringae* subsp. *syringae*는 syringomycin 생성력과 병원성을 유지하였다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서 시도한 모든 세균들은 생존율이 아주 저조하였다(미발표). 살균증류수 저장법은 특별한 기술이 요구되지 않고 간단하고 신속하게 저장할 수 있으므로 시간과 노동력이 절감되며 아주 작은 크기의 Nunc cryotube를 이용

하여 실온에서 보관하게 되므로 경제적이고 좁은 장소에서도 보관이 가능하다. 또한 균주의 장기적인 보관에서 문제가 되는 응애등의 오염에 의한 가능성도 배제시킬 수 있으며 실험에 사용하기 위하여 필요한 균주가 있으면 언제든지 해당 튜브에서 agar disc를 꺼내어 배지에 옮겨 사용할 수 있는 장점이 있다. 따라서 식물병원균주의 살균종류수 저장법은 저장되어 있는 균주들의 생존율 및 병원성 유지에 대한 조사가 계속적으로 수행되어야 하겠지만 진균의 경우에는 몇 종류의 병원균을 제외하고는 대부분의 균주들이 저장 후 최소 1년까지 생존이 가능하고 또한 병원성도 유지시킬 수 있는 방법으로 확인되었다.

### 참고문헌

1. Boesewinkel, H. J. 1976. Storage of fungal cultures in water. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66:183-185.
2. Clark, G. and Dick, M. W. 1974. Long-term storage and viability of aquatic Oomycetes. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 63:611-612.
3. Dhingra, O. D. and Sinclair, J. B. 1985. Long-term storage of plant pathogens. In: *Basic Plant Pathology Methods*, pp.49-65. CRC Press, Florida.
4. Ellis, J. J. 1979. Preserving fungus strains in sterile water. *Mycologia.* 71:1072-1075.
5. Iacobellis, N. S. and Devay, J. E. 1986. Long-term storage of plant pathogenic bacteria in sterile distilled water. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:388-389.
6. Johnston, A. and Booth, C. 1983. Maintenance of culture collection. In: *Plant pathologist's pocketbook*, pp.335-337. Commonwealth Mycological Institute.
7. Marx, D. H. and Daniel, W. J. 1976. Maintaining cultures of ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile water cold storage. *Can. J. Microbiol.* 22:338-341.
8. Smith, D. 1991. Maintenance of filamentous fungi. In: *Maintenance of microorganisms and cultured cells*, ed. by B. E. Kirsop and A. Doyle. pp.133-159. Academic Press, London.