지치 육묘시 발생하는 유묘썩음증상 원인균 분리 · 동정 및 경감 육묘환경에 관한 연구

안태진*† · 신규섭** · 안영섭* · 허목* · 박충범*

*농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, **충남대학교 농업생명과학대학 농생물학과

Identification of Fungal Pathogen Causing Seedling Rot of *Lithospermum erythrorhizon* and Study on the Optimum Growing Temperature for Decreasing of the Seedling Rot

Tae Jin An*†, Kyu Seop Shin**, Young Sup Ahn*, Mok Hur* and Chung Berm Park*

*Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 369-873, Korea.

**College of Agricultural and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea.

ABSTRACT : This study was conducted to isolate and identify the fungal pathogen causing seedling rot of *Lithospermum erythrorhizon* Siebold & Zuccarini, and to know the optimum growing temperature for decreasing seedling rot of *Lithospermum erythrorhizon*. On the basis of morphological characteristics, *EF-1a* sequence analysis, and pathogenecity to host plant, the fungi isolated from seedling rot and seeds of *Lithospermum erythrorhizon* were identified as *Fusarium fujikuroi*, indicating that disease causing fungus is seed-borne pathogen. Optimum temperature for germination of seeds of *Lithospermum erythrorhizon* was 15 ~ 20°C, but pathogenicity of *Fusarium fujikuroi* was shown more readily at 25 ~ 30°C. These results suggested that seedling culture of *Lithospermum erythrorhizon* between 15°C and 20°C might reduce seedling rot of *Lithospermum erythrorhizon* caused by seed-borne pathogen *Fusarium fujikuroi*.

Key Words : *Lithospermum erythrorhizon*, Seedling Rot, *Fusarium fujikuroi*, Pathogen

서 언

지치 (*Lithospermum erythrorhizon* Siebold & Zuccarini)는 지치과 (Boraginaceae), 지치속 (*Lithospermum*)의 우리나라 전국 산이나 들의 풀밭에 자생하는 다년생 초본 식물로서 자초, 지초 등의 이명으로 불리는데, 한방에서는 이용부위인 뿌리의 생약명을 자근(紫根)이라 하여 혈액순환 촉진, 해열, 해독 작용에 주로 이용하거나 토혈, 혈뇨, 변비, 화상, 습진, 요로 감염 등을 치료하는데 사용하고 있으며 (Lee *et al.*, 1998), 지초 뿌리에 함유되어 있는 안토시아닌 계통의 적자색 색소는 식용색소 또는 생활소재의 색소로도 이용되고 있다. 지치의 식물적 특성은 줄기가 곧게 서고, 키는 30 ~ 70 cm, 뿌리는 땅속 깊이 들어가며, 굵고, 뿌리의 껍질색은 자주색이다. 줄기와 잎에는 털이 많으며, 잎은 서로 마주보고 나고 모양은 피침형으로서 양 끝이 가늘다. 꽃은 5 ~ 6월에 흰색으로 줄기 끝에서 총상화서로 피고, 열매는 회색으로서 광택이 나며

원형이다. 지치의 효능 및 기능성에 대하여는 식중독 세균에 대한 항균효과, 멜라닌 생합성 억제효과, 식품의 저장성 연장 효과, LDL 산화 저해활성과 FPTase 저해활성, 초고압 가공 처리된 지치 추출물의 항암 활성 증진, 미백활성 증진 효과 등 (Bae, 2004; Lee *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006, 2009, 2011; Seo *et al.*, 2011)이 보고된 바 있다. 지치는 전라남도 진도군, 충청북도 제천군에 주산지가 형성되어 재배되고 있는데 재배중의 병해로는 *Phoma* sp.에 의한 점무늬병, *Rhizoctonia solani*에 의한 잎썩음병 등이 보고된바 있으며 (Lee *et al.*, 1991), 장마기에 이들 병원균에 의한 피해로 수확량 감소가 많은 작물이다. 본 연구에서는 지치 재배 시 유묘가 흰색의 기증균사로 덮이고 썩으나 아직까지 그 원인균이 밝혀져 있지 않은 유묘썩음증상의 원인균을 분리, 동정하고 종자 전염 여부와 유묘썩음증상을 억제하거나 최소화 시킬 수 있는 경종적 육묘온도 범위를 구명하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

†Corresponding author: (Phone) +82-43-871-5573 (E-mail) atj0083@korea.kr

Received 2012 November 16 / 1st Revised 2012 November 30 / 2nd Revised 2013 January 3 / Accepted 2012 January 18

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 경과

본 연구는 충북 음성군 소이면에 위치한 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 시험포장에서 2010년 10월에 채종된 지치 종자를 4℃의 저온저장고에 밀봉 보관하였다가, 2011년 4월에 육묘이식재배를 위한 육묘과정에서 육묘가 흰색의 기증균사로 덮이고 일부가 썩는 증세를 나타내므로 (Fig. 1) 육묘썩음증상 원인균의 분리·동정 및 병 발현 적정온도 구명 실험을 수행하였다.

2. 육묘썩음증상 원인균 분리 및 특성 조사

지치 종자의 트레이 육묘 시 발생한 육묘썩음증상 원인균을 분리하고자 병든 식물체의 병반부위를 3×3 mm 크기로 잘라서 채집한 병반을 다른 병원균에 의한 오염을 방지하고자 1%의 차아염소산나트륨 (NaOCl) 용액으로 2분간 표면소독한 후 멸균된 증류수로 세척한 다음 물기를 말리고 Water agar를 도포하고 그 위에 치상하여 25℃의 항온기에서 2일간 배양하였다. 배양된 균사는 선단부를 잘라내어 PDA, Carnation leaf agar (CLA)에 접종하여 20℃ 배양기에서 암 상태로 10일 간 배양하면서 균총의 색, 소형 및 대형 분생포자의 크기와 모양, 격벽의 개수를 현미경으로 관찰하였다.

3. 지치 육묘썩음증상 원인균 동정을 위한 PCR 및 염기서열 계통 분석

지치 육묘썩음증상 원인균 동정을 위하여 육묘썩음 부위로부터 분리된 균주를 PDA배지에 접종하여 20℃에서 7일간 암 상태로 배양하여 균사체를 얻었다. 균사체는 PCR 분석을 위하여 동결건조한 후 소량을 1.5 ml tube에 넣고 마쇄한 후 extraction buffer (200 mM Tris-HCL(pH 8.0), 200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0.5% SDS) 400 µl와 proteinase K 5 µl를 첨가한 후 37℃에서 1시간 동안 방치한 다음 2×CTAB solution (1 M, NaCl; 100 mM, Tris; 20 mM EDTA; 1% w/v polyvinyl polypyrrolidone, PVPP) 400 µl를 첨가한 후 5~10분 동안 잘 섞은 다음 Chloroform : isoamylalcohol = 24 : 1 용액 700 µl

를 첨가하고 원심분리기에서 20℃로 10분간 12,000 rpm으로 원심분리하였다. 침전물 600 µl를 새로운 1.5 µl tube에 넣어준 후 다시 Chloroform : isoamylalcohol = 24 : 1 용액 700 µl를 첨가하고 같은 조건의 원심분리를 1회 반복 실시하였다. 원심분리 하여 얻어진 침전물에 다시 isopropanol 420 µl를 첨가하고 실온에서 10분간 방치한 후에 4℃에서 10분 동안 12,000 rpm으로 원심분리를 하여 DNA pellet을 침전시켰다. 그 후에 70%의 ethanol 500 µl로 DNA pellet을 세척한 후 12,000 rpm 4℃에서 10분 동안 원심분리 한 뒤 Vacuum pump로 30분 동안 건조시킨 후 50 µl의 멸균수를 넣어 용해시키고, 0.7% agarose gel에 전기영동 하여 DNA를 정량하였다. 실험에 활용하는 *Fusarium* 속 균의 종 특이적 프라이머인 *EF-1α* 유전자의 증폭은 94℃에서 initial denaturation 5분 후 94℃에서 denaturation 30초, 52℃에서 annealing 40초, 72℃에서 extraction 1분의 조건으로 35 cycle을 실시하고, final extension은 72℃에서 3분간 실시하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동 하여 DNA를 확인하였다.

PCR 산물은 PCR Clean-Up System (Promega, USA)으로 정제하여, (주)마크로젠에 의뢰하여 sequencing을 하였고 이로부터 얻어진 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)를 이용하여 DNA 데이터베이스와 유사한 염기서열을 비교하였다. Reference 균주는 ex-type 균주 및 신뢰도 높은 균주의 GenBank data를 참고하여 CLUSTAL X2 program (Thompson *et al.*, 1997)을 이용해 정렬하였고, 불분명하게 정렬된 부분은 분석에서 제외하였다. Maximum likelihood tree는 RAXML program (Stamakis *et al.*, 2008)을 이용하여 작성하였다.

4. 육묘썩음증상 원인균 *Fusarium fujikuroi*의 종자 전염 여부 검정

육묘썩음증상의 원인균으로 추정되는 *Fusarium fujikuroi*의 종자 전염 여부를 검정하고자 지치 종자 30립을 100×15 cm 페트리디쉬에 치상하고 7일간 25℃의 항온기에서 배양한 후 종자의 표면에 발생한 균을 단포자 분리하여 상기 3의 방법과 동일하게 PCR 및 염기서열 계통 분석을 실시하여 동일 원인균 여부를 검정하였다.

5. 분리·동정된 육묘썩음증상 원인균의 병원성 및 발현 적정온도 검정

지치 육묘썩음 부위로부터 분리한 *Fusarium fujikuroi*의 병원성검정을 위해 30×20 cm의 플라스틱 사각포트에 121℃에서 30분간 2회 고압 멸균한 원예용상토를 담은 후 1% NaOCl 용액으로 1분간 표면소독 한 지치 종자를 포트 당 100립씩, 12개의 포트에 파종하였다. 이후 파종한 종자 사이에 25℃ 항온기에서 1주일간 PDA 배지를 이용하여 배양한

Fig. 1. Seedling rot of *Lithospermum erythrorhizon*. A; typical symptom in the field, B; symptom induced by artificial inoculation.

*Fusarium fujikuroi*의 생육이 가장 왕성한 외곽 부위를 잘라내어 접종한 후 15, 20, 25, 30°C의 온도로 각각 조절된 상대습도 98%의 접종상에서 온도별로 각각 3개의 파종 포트를 15일간 존치시켜 파종 종자의 발아율을 조사하였으며, 다시 5일이 지난 후 출아한 유묘의 생존 개체수를 조사하여 분리 · 동정된 *Fusarium fujikuroi*의 병원성과 병원성균의 적정 발현온도를 검정하였다.

6. 유묘썩음증상 억제 또는 최소화를 위한 지치 종자의 육묘 온도 적정범위 구명 실험

100 × 15 cm 페트리디쉬에 2장의 여과지를 깔고 지치 종자를 100립씩 3반복으로 파종한 후 15, 20, 25, 30°C로 각각 설정된 인큐베이터 내에 존치하고 수분이 마르지 않도록 피펫을 사용하여 수시로 급수하며 파종 후 3주간 동안 매일 동일한 시간에 발아율, 발아시, 발아기 (40% 발아한 날) 및 발아종 (80% 발아한 날)을 조사하여 유묘썩음증상의 원인균인 *Fusarium fujikuroi*의 적정 발현온도를 회피하기에 적합한 지치종자의 육묘가능 적정온도를 구명하여 경종적 육묘환경에 활용하고자 하였다.

결과 및 고찰

1. 지치 유묘썩음증상 원인균 분리 및 특성

유묘썩음증상 병반이 도포된 Water Agar로부터 분리한 병원균을 PDA에서 10일간 배양한 배지상의 균층 앞면 색깔은 흰색 (Fig. 2A), 뒷면은 옅은 분홍색 (Fig. 2B)을 나타내었다. Carnation Leaf Agar (CLA)에서 대형분생포자는 가느다란 초승달 모양으로서 3~4개의 격벽을 가졌으며 크기는 길이 38~41.1 µm, 폭 3.26~3.24 µm였고 (Fig. 2C, Table 1), 소형 분생포자는 난형의 기부가 평평한 모양으로 0~1개의 격벽을 가졌으며 크기는 길이 6.48~16.19 µm, 폭 1.14~2.27 µm였다 (Fig. 2D, Table 1). 따라서 분리된 균주는 이러한 형태적 특징을 통하여 Leslie 등 (2006)의 방법에 따라 *Fusarium* 속에 포함되는 진균으로 동정되었다.

2. 지치 유묘썩음증상 원인균 동정 및 종자 전염 여부

Fusarium 속 균의 종 특이적 프라이머인 Translation elongation factor 1-alpha (*EF-1α*) 유전자 염기서열 분석 결과, 유묘썩음증상 으로부터 분리한 균은 Watanabe 등 (2011, 2012)의 동정방법과 동일하게 GenBank에 등록된 *Fusarium fujikuroi*와 상동성을 나타내어 지치 유묘썩음증상에서 분리된 균은 *Fusarium fujikuroi* 임이 동정되었다.

지치 유묘썩음증상 원인균의 종자전염 여부를 검정하고자 지치 종자 30립을 7일간 25°C의 항온기에서 배양한 후 종자의 표면에 발생한 균을 단포자 분리한 결과, *Phoma* sp.와

Fig. 2. Morphological characteristics of *Fusarium fujikuroi*. A, B; colony of *F. fujikuroi*, C; macroconidia, D; microconidia. Scale bar = 10 µm.

Table 1. Morphological characteristics of *Fusarium fujikuroi*.

	Structure	Characteristics
Macroconidia	no. septate	3-4
	length × width (µm)	38-41.1 × 3.26-3.24
	shape	Relatively slender
Microconidia	no. septate	0-1
	length × width (µm)	6.48-16.19 × 1.14-2.27
	shape	Oval, club shaped with a flattened base

Fig. 3. Maximum likelihood tree of the *Fusarium* genus inferred from *EF-1α* genes. Numbers above the branches indicate bootstrap values. Fungi isolated from seed and seedling of *Lithospermum erythrorhizoni* are indicated in bold.

Fusarium sp. 두 종의 진균이 분리되었으며 분리된 *Fusarium* sp. 균주에 대하여 PCR 및 *EF-1α* 유전자 염기서열 분석을 실시한 결과, *Fusarium fujikuroi*로 동정되어 유묘썩음증상으로부터 분리된 균과 동일한 종의 균임을 알 수 있었다 (Fig. 3).

Fig. 4. Growing status of seedlings depending on the germination temperatures and periods of seeds of *Lithospermum erythrorhizoni* inoculated by *Fusarium fujikuroi*. A; 15 days after sowing, B; 20 days after sowing.

Table 2. Survival rates depending on the seed germination temperatures and periods of seeds of *Lithospermum erythrorhizoni* inoculated by *Fusarium fujikuroi*.

Days after sowing	Survival rates (%)			
	15°C	20°C	25°C	30°C
15 days	65	67	13	46
20 days	65	67	5	39

따라서 지치의 유묘썩음증상 원인균인 *Fusarium fujikuroi*는 종자 전염되는 균으로 판명되었다.

3. 지치 유묘썩음증상 원인균 *Fusarium fujikuroi*의 병원성 및 발현 적정온도

지치 유묘썩음증상의 원인균으로 밝혀진 *Fusarium fujikuroi*를 접종한 지치 종자를 온도 15, 20, 25, 30°C, 습도 98%로 조절된 인큐베이터 내에서 15일간 치상시킨 후 지치 종자의 발아율을 조사한 결과, 15°C에서는 65%, 20°C에서는 67%, 25°C에서는 13%, 30°C에서는 46%의 발아율을 나타내었고, 이후 5일이 경과되어 유묘의 생존율을 조사한 결과, 15~20°C에서는 5일전의 발아 개체수가 65~67%로 동일하게 유지되고 있었으나, 25°C에서는 생존율이 5일전의 13%에서 5%로, 30°C에서는 5일전의 46%가 39%로 낮아져 지치 유묘썩음증상의 원인균인 *Fusarium fujikuroi*의 병원성은 25~30°C에서 발현이 잘되는 것을 알 수 있었다 (Table 2, Fig. 4A & 4B).

4. 지치 종자의 발아 적온

인큐베이터 온도를 15, 20, 25, 30°C로 각각 고정한 후 지치 종자를 치상하여 발아율을 조사한 결과, 15°C와 20°C에서는 발아율이 각각 88%, 75%, 25°C와 30°C에서는 61%, 41%로서 온도가 높아질수록 종자의 발아율이 낮아졌다. 지치 종자의 발아에 소요되는 기간은 3~4일 정도로서 발아는 치상온도에 관계없이 일정하였으나, 과중 종자의 40%가 발아되

Fig. 5. Changes of germination rates depending on days after sowing and incubation temperatures of seeds of *Lithospermum erythrorhizoni*.

는데 소요되는 기간은 15~20°C에서는 4일, 25°C에서는 6일, 30°C에서는 17일이 소요되었고, 과중 종자의 80%가 발아되는데 소요되는 기간은 15°C에서는 7.5일이 소요되었지만 20, 25, 30°C에서는 구할 수 없었다 (Fig. 5). 따라서 지치종자는 15°C에서 발아가 잘되는 저온 발아성 종자임을 확인할 수 있었다.

5. 지치 유묘썩음증상 원인균 *Fusarium fujikuroi*의 발현 저해 온도조건 종합고찰

본 연구에서 밝혀진 지치 유묘썩음증상의 원인균은 썩음증상이 나타나는 유묘로부터의 분리균주에 대한 *EF-1α* 유전자 영역 염기서열 및 NCBI에 등록된 균의 염기서열을 비교 분석한 결과, *Fusarium fujikuroi*로 동정되었으며, 본 분리균은 종자로부터 분리되어 동정된 균과 동일하여 지치의 유묘썩음증상은 종자 전염되어 발생하는 것으로 판단되며, *Fusarium fujikuroi*의 병원성은 25~30°C에서 발현이 잘됨이 증명되었다. 반면에 지치 종자는 비교적 저온인 15~20°C에서 발아가 잘되는 저온 발아성 종자임이 검증되어, 약용작물 지치의 육묘이식재배를 위한 종자 육묘는 15~20°C정도의 저온에서 실시함으로써 유묘썩음 증상을 회피하여 건전묘를 생산할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 시험연구사업(PJ007312)의 연구비로 수행된 결과로 이에 감사를 드립니다.

LITERATURE CITED

- Bae JH.** (2004). Antimicrobial effect of *Lithospermum erythrorhizon* extracts on the food-borne pathogens. Korean Journal of Food Science and Technology. 36:823-827.
- Kim JS, Kim TY and Kim SB.** (2006). Evaluation of storage characteristics of Kangjung added with gromwell extracts. The Korean Journal of Food and Nutrition. 35:791-800.
- Kim GS, Jeong TS, Kwon BM, Kim YO, Cha SW, Song KS and Baek NI.** (2009). Inhibitory effect of acetylshikonin from roots of *Lithospermum erythrorhizon* on LDL oxidation and FPTase activity. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 52:221-225.
- Kim JS and Kang NH.** (2010). Antioxidant activity of solvent fractions from cultivated and wild gromwell. The Korean Journal of Food and Nutrition. 39:789-795.
- Kim JS, Jeong MH, Choi WY, Seo YC, MA CJ, Ahyn JH, Kim NS, Hwang B, Cho JS and Lee HY.** (2011). Enhancement of whitening effects of *Lithospermum erythrorhizon* extracts by ultra high pressure. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 19:97-102.
- Kim GS, Park CG, Lee KH, Choi JH, Lee SE, Noh HJ, Lee JH and Kim SY.** (2011). Investigation of shikonin pigments and antioxidant activity of the roots from *Lithospermum erythrorhizon* according to the different growth stages and areas of cultivation. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 19:435-440.
- Lee EJ, Lee YH, Cho WD, Kim WG and Jin KS.** (1991). Compendium of medicinal plant diseases with colour plates. National Institute of Agricultural Science and Technology. Suwon, Korea. p.105-107.
- Lee HH, Bai S and Chin JE.** (2005). Inhibitory effect of *Lithospermum erythrorhizon* extracts on melanin biosynthesis. The Korean Journal of Food and Nutrition. 34:1325-1329.
- Leslie JF and Summerell BA.** (2006). The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. Ames. Iowa, USA. p.172-173.
- Seo YC, Choi WY, Kim JS, Cho JS, Kim YO, Kim JC and Lee HY.** (2011). Enhancement of anticancer activities from *Lithospermum erythrorhizon* extracts by ultra high pressure process. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 19:103-110.
- Stamatakis A.** (2008). RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics. 22:2688-2690.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG.** (1997). The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Resources. 25:4876-4882.
- Watanabe M, Yonezawa T, Lee K, Kumagai S, Sugita-Konishi Y, Goto K and Hara-Kudo Y.** (2011). Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. BMC Evolutionary Biology. 11:322.
- Watanabe M, Goto K, Sugita-Konishi Y, Kamata Y and Hara-Kudo Y.** (2012). Sensitive detection of whole-genome differentiation among closely-related species of the genus *Fusarium* using DNA-DNA hybridization and a microplate technique. The Journal of Veterinary Medical Science. 74:1333-1336.