

## 고추 탄저병균의 포자 발아와 부착, 균사 생장에 미치는 화합물의 활성 검정법 확립 및 살균제의 효과

김재정 · 김준태 · 박성우 · 박은숙 · 김흥태\*

충북대학교 농과대학 농생물학과

**요약** : 본 실험에서는 microtiter plate를 이용하는 실내 검정법을 이용하여 고추 탄저병균의 기주체 침입 초기에 볼 수 있는 형태 변화인 포자 발아 및 부착과 균사 생장에 미치는 다양한 화합물의 활성을 대량으로 검정할 수 있는 방법을 확립하였고, 기존의 몇 가지 살균제가 가지는 고추 탄저병균의 초기 형태 분화에 대한 억제 효과를 조사하였다. 본 실내 검정법을 표준화하기 위하여 MTT와 propanol 처리, 접종하는 포자의 농도, 배양 시간들이 병원균의 흡광도에 미치는 영향을 조사하였다. MTT를 12 시간, propanol을 1시간 처리하였을 때, 그리고 JC24의 포자를  $1 \times 10^5$  개/mL의 농도로 접종하고 36시간 배양하였을 때, 병원균의 흡광도가 일관성 있고 높게 나타났다. 살균제의 작용 특성을 알아보기 위해서 6종의 보호용 살균제, 6종의 스테롤 생합성 저해 살균제, 1종의 호흡저해제를 선발하여 microtiter plate 대량 검정 방법에서 효과를 조사하였다. 보호용 살균제 중에서 mancozeb, chlorothalonil, dithianone 등은  $6.25 \mu\text{g/mL}$  처리구에서도 포자의 발아, 부착과 균사의 생장을 모두 80% 이상 억제하였으나, propineb, iminoctadine, fluazinam 등은  $100 \mu\text{g/mL}$ 의 처리를 2시간만에 세척하였을 때 흡광도가 감소하는 것으로 보아 포자 부착 억제 효과는 적었다. 6종의 스테롤 생합성 저해제 중에서 hexaconazole, tebuconazole, myclobutanil 등은 포자의 발아와 균사 생육을 억제하고, 세척할 경우 JC24의 생육 억제 효과가 떨어지는 것을 보아 부착 억제 효과는 기대할 수 없었다. Nuarimol은  $100 \mu\text{g/mL}$ 로 처리한 고농도에서만 부착에 대한 억제 효과가 54.7%로 다른 억제 효과보다 우수하였으나,  $6.25 \mu\text{g/mL}$ 의 저농도로 처리하였을 때는 부착 억제 효과가 나타나지 않았다. Kresoxim-methyl은  $6.25$ 와  $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 포자 부착에 대한 억제율이 27.3%와 54.4%로 나타났는데, 처리하는 농도가 높아짐에 따라서 효과도 증가하였다. 이상의 결과와 같이 microtiter plate를 사용하여 병원균이 식물체를 침입하는 초기에 나타나는 포자 발아와 부착, 그리고 균사 생장을 검정할 수 있었으며, 본 실험 방법을 통하여 Kresoxim-methyl은 탄저병균의 포자 부착을 특이적으로 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.(2003년 4월 7일 접수, 2003년 9월 22일 수리)

**Key words** : Microtiter plate assay, spore adhesion, red pepper anthracnose.

### 서론

최근의 농약 연구에서는 신규 살균제를 개발하기 위해서 다양한 구조를 지닌 다수의 화합물의 확보에 많은 관심을 기울이고 있는데, 새로운 합성 기술이나 조합 화학을 통하여 화합물을 확보하거나, 다수의 화합물을 확보하고 있는 기관에 경비를 부담하고 화합물을 사오기도 한다. 또는 미생물이나 식물의 추출물과 같은 천연물질을 확보하고자 노력하기도 한다. 신

규 살균제의 개발이 점점 어려워지면서 신규 화합물의 수는 십만 개에서 백만 개까지 필요하게 되었으며, 또 많은 수의 화합물의 활성을 단시간에 검정할 수 있는 새로운 검정 방법의 확립이 요구되고 있다 (Cormrod와 Hawkes, 1995). 따라서 다수의 화합물의 활성을 검정할 수 있는 새로운 방법의 확립은 살균제 개발 전략과 밀접한 관계를 가지게 되었다.

신규 살균제를 개발하기 위한 화합물의 활성 검정 방법으로는 식물체를 직접 사용하는 온실 검정 방법과 실험실 내에서 병원균을 이용하는 *in vitro* 방법을 들 수 있다(조, 1990). 두 가지의 방법은 모두 장단점

\*연락처자

을 지니고 있지만, 다수의 화합물의 활성을 신속하게 검정하며 각 화합물이 갖는 작용 특성에 대한 정보를 얻기 위해서는 *in vitro*의 방법을 사용하는 것이 좋다. 식물병원 곰팡이에 대한 화합물의 활성을 검정하는 *in vitro* 방법으로는 여러 가지의 방법이 있지만, 포자 발아에 대한 억제 효과를 조사하는 방법이 다른 방법과 비교하여 빠른 시간 내에 곰팡이에 대한 화합물의 활성을 측정할 수 있는 방법이 될 수 있다(Slawecki 등, 2002). 하지만 현미경을 이용하여 포자의 발아를 확인하는 작업은 결코 용이한 작업은 아니다. 이와 같이 결과 관찰의 어려운 점을 개선하고자, 최근에는 96 well microtiter plate에서 배양한 병원균의 성장 정도를 흡광도로 측정하는 방법이 제안되었다(Wedge와 Smith, 2000; 최 등, 2000). Wedge와 Smith(2000)는 16종의 살균제가 *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. fragaria*의 균사 생육에 미치는 효과를 microtiter assay를 통해서 조사하였다. 하지만 부피가 작고 한정적인 96 well microtiter plate의 well에서는 병원균의 성장을 흡광도를 측정하여 비교한다는 것은 어려운 일이다. 따라서 병원균의 균사 성장을 정량적으로 측정할 수 있는 방법이 제안되어야 한다. 손 등(1999)은 *Colletotrichum gloeosporioides*의 균사 생육에 미치는 영향을 조사하기 위해서 배양한 균사체를 trypan blue로 염색한 후 흡광도를 측정하였고, Freimoser 등(1999)은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 처리함으로써 병원균의 성장 정도를 보다 정확하게 조사할 수 있는 방법을 보고하였다. 배양한 균사체에 MTT를 처리하면 처리된 MTT는 균체의 호흡과정 중에서 환원되어 물에 녹지 않는 보라색의 formazan이라는 결정체를 세포 안에 만들게 되기 때문에, 균체에 propanol을 처리하여 formazan의 결정체를 추출한 후 595 nm에서 흡광도를 측정함으로써 균사 성장 정도를 조사할 수 있었다. 이러한 연구 결과는 실험실 내에서 다수의 화합물이 식물 병원 곰팡이의 침입 초기에 나타나는 형태 분화에 미치는 효과를 효율적으로 검정하는데 사용될 수 있을 것으로 생각한다.

본 실험에서는 최 등(1999)과 Freimoser 등(1999)의 방법을 이용하여 탄저병 포자의 침입 초기 형태 분화에 미치는 화합물의 효과를 검정하기 위한 방법을 최적화하였고, 기존의 몇 가지 살균제가 탄저병균의 포자 발아와 부착, 그리고 균사 생장에 미치는 효과를

조사하였다.

## 재료 및 방법

### 시용균주

2001년 충북 진천의 고추 재배지에서 탄저병에 심하게 감염된 고추를 채집하여 병원균을 분리하였다. 25°C에서 1일간 습실 처리한 이병 고추의 병반에서 형성된 분생포자를 단포자 분리하였으며, 이 균주를 JC24로 명명하였다. 분리한 탄저병균은 PDA(potato dextrose agar, Difco) 사면 배지에서 배양하여 4°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

### 접종원 준비

실험에 사용한 탄저병균 JC24의 포자를 수확하기 위하여 PDA에 접종하고 25°C의 암 상태에서 7일간 배양하였다. 병원균을 배양한 PDA 배지에 plate 당 1/10로 희석한 PDB(potato dextrose broth, Difco)를 20 mL씩 붓고, 멸균한 붓으로 포자를 수확한 후 거즈에 여과하여 균사체를 제거하였다. 현미경으로 포자 현탁액의 포자를 관찰하며  $1 \times 10^5$  개/mL로 포자의 농도를 조정하였다.

### 병원균의 성장 측정

수확한 JC24의 포자 현탁액( $1 \times 10^5$  개/mL)을 96 well microtiter plate(SPL Labware)의 한 well 당 90  $\mu$ L씩 접종하고, 25°C의 암 상태에서 24시간 배양하였다. 0.5 mg/mL의 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 용액을 10  $\mu$ L씩 처리하고, 다시 25°C의 암 상태에서 12시간동안 배양하였다. 배양 여액을 모두 제거하고 well 당 propanol을 100  $\mu$ L씩 분주한 후, 상온에서 1시간동안 보관하였다가 595 nm에서 흡광도를 조사하였다.

### 병원균의 흡광도에 미치는 탄저병균 포자 농도 및 MTT 첨가 효과

Microtiter plate에서 배양한 병원균의 흡광도를 측정할 때, MTT와 propanol을 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때를 비교하였다. MTT와 propanol의 처리는 위에서 서술한 것과 동일하게 병원균을 24시간 배양하고 MTT를 12시간 처리한 다음, 1시간 동안 propanol을 처리하여 595 nm에서 흡광도를 조사하였다.

무처리구에서는 MTT와 propanol의 처리없이 병원균을 36시간 배양하여 595 nm에서 흡광도를 조사하였다. 또한 접종하는 포자의 농도와 병원균의 배양 시간이 병원균의 흡광도에 미치는 영향도 조사하였다. JC24의 포자 농도를  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  개/mL로 조절하여 microtiter plate에 접종하고, 12, 24, 36, 48 시간 동안 배양한 후, MTT를 12시간 처리하였다. MTT 용액을 세척한 후 propanol을 1시간 처리하고 595 nm에서 흡광도를 조사하였다.

### 탄저병균의 기주 침입 초기 단계에 미치는 살균제의 특이적 억제 효과 조사

6종의 보호용 살균제와 6종의 스테롤 생합성 저해 살균제, 그리고 호흡을 저해하는 것으로 알려져 있는 kresoxim-methyl을 실험에 사용하였다.

실험용 살균제는 모두 원제를 사용하였으며, DMSO (dimethyl sulfoxide)에 용해시켜 병원균을 접종한 배지에 처리하였는데, DMSO의 최종 농도가 1%를 넘지 않도록 조절하였다. 사용한 살균제의 최종 농도는 100  $\mu$ g/mL부터 1/4씩 희석하여 0.02  $\mu$ g/mL까지 처리하였다.

포자농도를  $1 \times 10^5$  개/mL로 조정된 포자 현탁액을 microtiter plate에 99  $\mu$ L씩 접종하였다. 병원균의 포자를 접종함과 동시에 DMSO에 용해시킨 살균제를 1  $\mu$ L씩 처리하여, 병원균의 포자 발아에 미치는 효과를 조사하였다. 또 균사 생장 억제 효과만을 조사하기 위하여 병원균의 포자를 접종하고 25°C에서 6시간 배양한 후에 살균제를 처리하였다. 실험에 사용한 살균제가 병원균의 포자가 기주 식물의 표면에 부착하는데 미치는 영향을 간접적으로 조사하기 위해서, 앞에서 서술한 것과 동일한 방법으로 microtiter plate에 접종한 병원균에 살균제를 처리하고 microtiter plate의 표면에 어느 정도 부착하는 지를 조사하였다. 살균제를 처리하고 25°C에서 2 시간동안 배양한 다음, microtiter plate를 1/10로 희석한 새로운 PDB로 2회 세척하였다. 다시 1/10로 희석한 PDB를 각 well 당 100  $\mu$ L씩 microtiter plate에 분주하고 25°C의 암상태에서 36 시간 동안 배양하였다. 병원균의 생장 정도는 위에서 기술한 것과 같이 MTT와 propanol을 처리한 후, 흡광도를 측정하여 조사하였다.

각각의 실험에서 병원균의 포자 발아와 부착, 균사 생장에 미치는 살균제의 억제율은 살균제 무처리구와

처리구의 흡광도를 다음의 식에 대입하여 구하였다.

$$\text{억제율 (\%)} = 1 - \frac{\text{살균제 처리구의 흡광도}}{\text{살균제 무처리구의 흡광도}} \times 100$$

## 결 과

### MTT와 propanol의 처리가 병원균의 흡광도에 미치는 영향

MTT와 propanol 처리와 접종한 포자의 농도는 병원균의 흡광도에 영향을 미쳤다(그림 1). JC24의 포자 농도가  $1 \times 10^4$  개/mL일 때, MTT를 12시간동안 처리하였을 때가 MTT 무처리구보다 높은 흡광도를 나타냈다. 또한 MTT 처리와 함께 1시간 동안 propanol을 처리하였을 때가 MTT 단독 처리구보다 흡광도가 더 높았다.  $1 \times 10^6$  개/mL의 농도로 JC 24를 접종하였을 때도 MTT 무처리구보다는 MTT 처리구에서 유의성 있게 높은 흡광도를 나타냈으나, MTT 단독 처리구와 MTT와 propanol 처리구의 흡광도 사이에는 유의성 있는 차이가 없었다.

Propanol의 처리가 mancozeb와 hexaconazole을 처리한 JC 24의 흡광도에 미치는 영향을 조사하였다(그림 2). 이 때 접종한 JC24의 분생포자 농도는  $1 \times 10^5$  개/mL로 조절하였다. Mancozeb는 1.0  $\mu$ g/mL보다 낮은 농도에서 propanol 처리구의 흡광도가 propanol을 처리하지 않은 무처리구의 흡광도보다 1.4에서 1.8배정도 높게 나타났으며, hexaconazole은 100  $\mu$ g/mL를 제외한 모든 처리 농도에서 약 1.8배정도 높게 흡광도가 나타났다. 이러한 결과는 처리한 살균제의 흡광도에 대한 억제율에 영향을 미쳤다. 예로서 Mancozeb의 흡광도 억제율은 propanol의 처리 여부에 따라서 변화하였는데, propanol을 처리하지 않은 0.1과 0.39  $\mu$ g/mL 처리구에서 56.9와 72.6%의 억제율을 보였던 것이, propanol을 처리한 실험구에서는 61.9와 88.2%로 억제율이 상승하였다.

### 접종한 포자 농도와 배양 시간이 흡광도에 미치는 영향

JC24를 24시간 배양하였을 때 접종한 포자의 농도 간에는 흡광도의 차이가 뚜렷하지 않았다(그림 3). 그러나 배양 시간이 36시간으로 증가함에 따라  $1 \times 10^5$  과  $1 \times 10^6$  개/mL의 농도로 접종한 JC24의 흡광도는 1.093과 1.206까지 급속하게 증가하였으나, 두 처리간

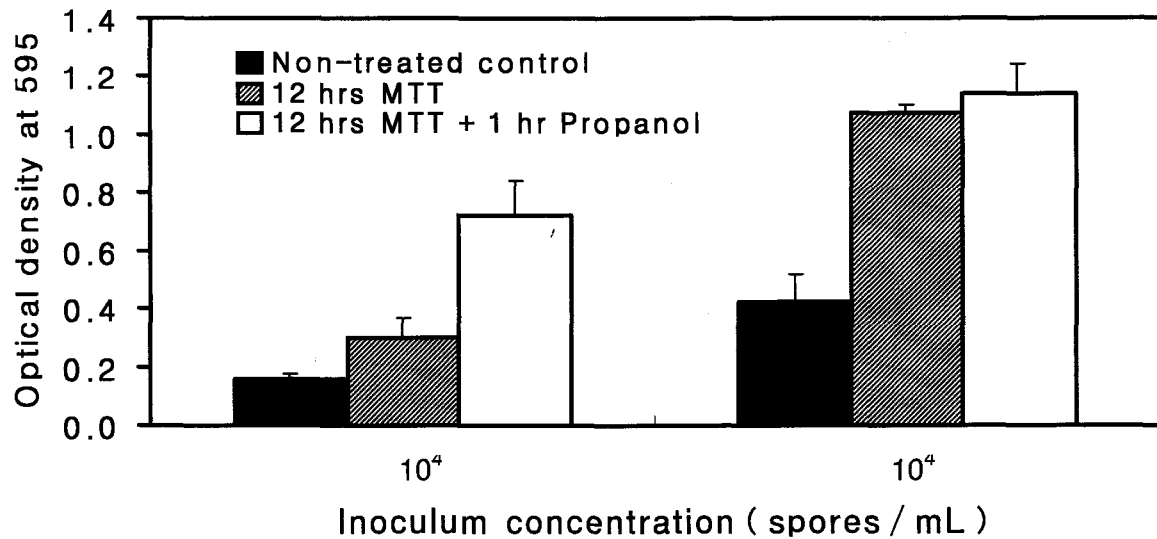


Fig. 1. The effect of MTT and propanol on mycelial optical density of *Colletotrichum* sp. JC24. The treatment of MTT for 12 hrs and/or propanol for 1 hr was conducted after incubation of JC24 for 36 hrs. Mycelial optical density was measured at 595 nm.

에는 통계적인 유의성이 없었다.  $1 \times 10^5$ 과  $1 \times 10^6$  개/mL의 농도로 분생포자를 접종한 JC24를 48시간 배양하였을 때, 36시간 배양하였을 때와는 다르게  $1 \times 10^6$  개/mL의 농도로 접종한 처리구의 흡광도가  $1 \times 10^5$  개/mL보다 미미한 차이로 높게 나타났다.  $1 \times 10^4$  개/mL의 농도로 접종한 JC24는 48 시간 후에 0.619까지 흡광도가 계속 증가하였다.

#### 병원균의 기주 침입 단계의 특이적 형태에 대한 기존 살균제의 억제 효과

기주의 침입 단계에 필요한 병원균의 여러 가지 형태 변화 중에서 분생포자의 발아와 기주체 부착 및 균사 생육에 대한 기존 살균제의 억제 효과를 micro-titer plate 상에서 조사하였다. 그림 4에서 보는 바와 같이 보호용 살균제들의 병원균 억제 양상은 두 가지

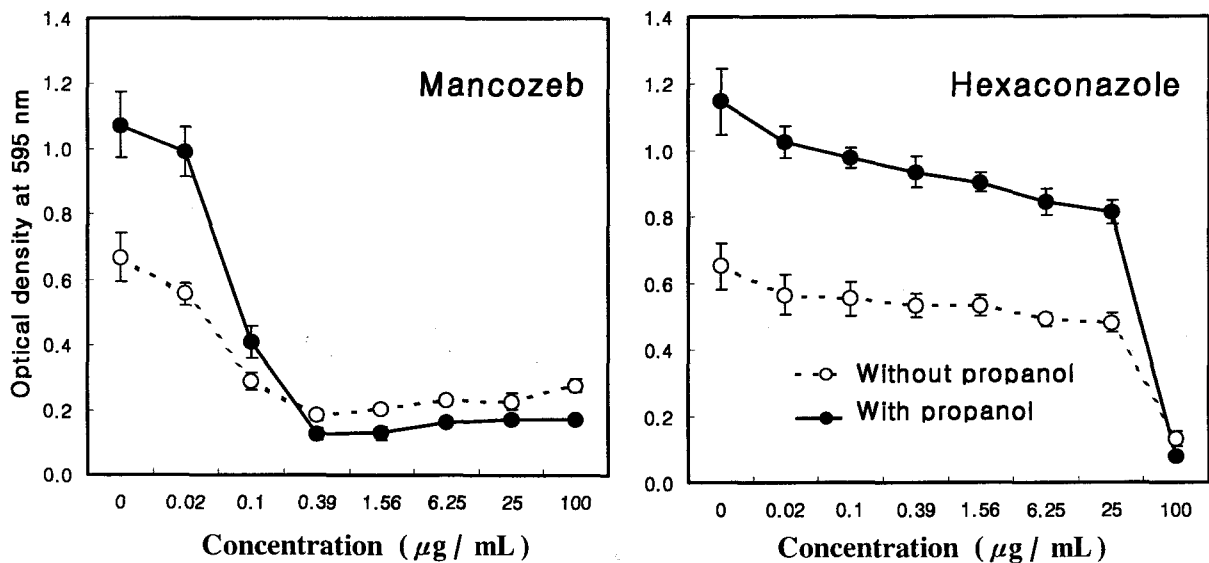


Fig. 2. The effect of propanol treatment on the optical density of *Colletotrichum* sp. JC24 applied with mancozeb and hexaconazole at various indicated concentrations. Following 36 hr incubation of *Colletotrichum* sp. JC24, 10 µL of MTT was treated. Propanol was treated for 1 hr subsequently after washing fungicides with new PDB.

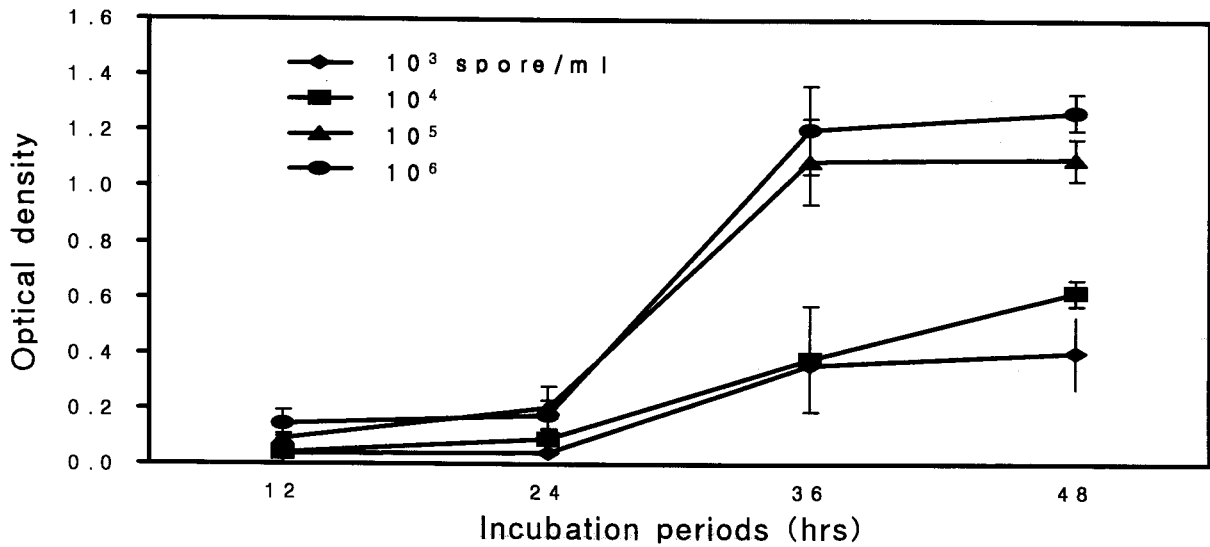


Fig. 3. The effect of inoculum density of *Colletotrichum* sp. JC24 on the optical density. Ninety  $\mu\text{L}$  of spore suspension of *Colletotrichum* sp. JC24 was poured into a well of microtiter plate, being adjusted to  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  and  $1 \times 10^6$  spores/mL. Spores were harvested from *Colletotrichum* sp. JC24, which was incubated for 7 days at  $25^\circ\text{C}$ , by flooding the surface of culture plates with PDB, scraping the surface with a sterile brush and filtering the suspension through cheesecloth.

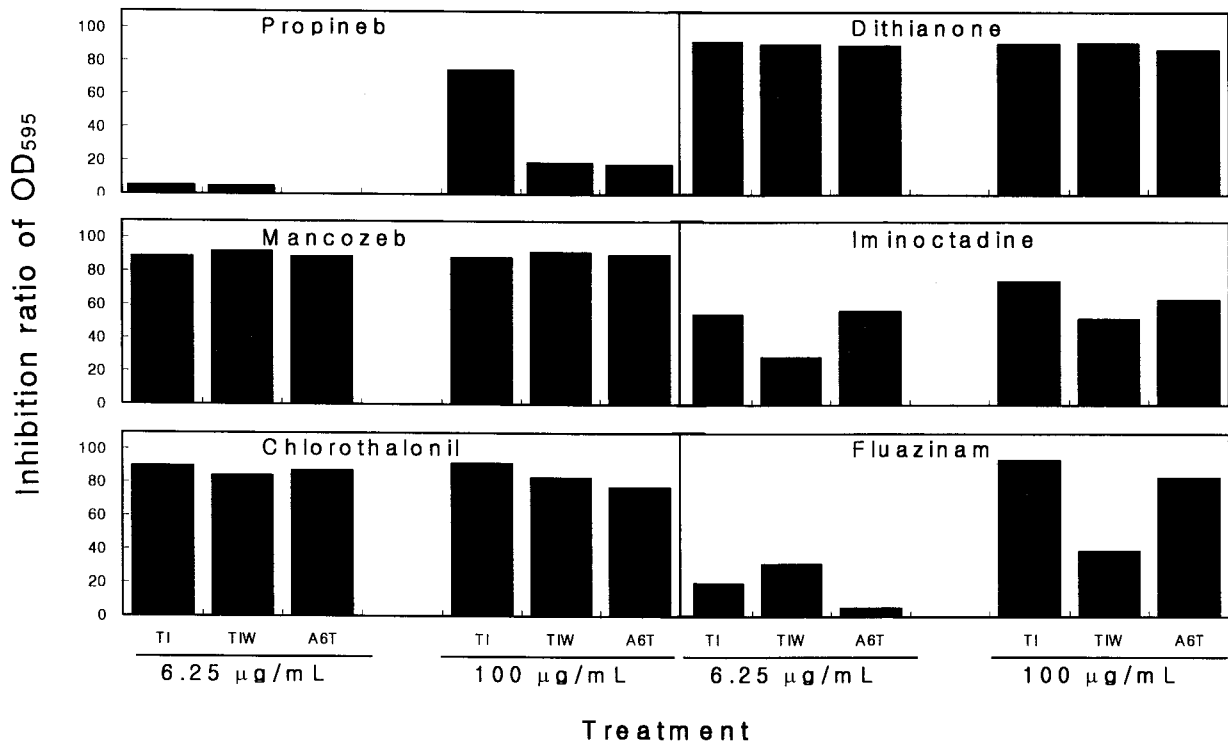


Fig. 4. The effect of 6 protective fungicides on spore germination, adhesion and mycelial growth of *Colletotrichum* sp. JC24 by microtiter plate assay. For the assessment of fungicidal activity against spore germination, mycelial growth and spore adhesion, fungicides dissolved with DMSO were treated at inoculation of JC24 immediately (TI), after incubation for 6 hrs (A6T), and following washing fungicides 2 hrs after incubation (TIW), respectively. The final concentration of DMSO was adjusted at about 1%.

의 그룹으로 구별할 수 있었다.

Mancozeb, chlorothalonil, dithianon 등은 6.25  $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 처리구에서도 포자 발아, 균사 성장, 포자의 부착을 조사한 모든 처리에서 85% 이상의 억제 효과를 보였다. 그러나 propineb, iminoctadine, fluazinam 등의 보호용 살균제들은 전체적으로 낮은 억제율을 보였고, 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 처리구에서 2시간 동안 살균제를 처리하고 세척한 후 조사한 포자 부착에 대한 억제율은, 포자 발아와 균사 성장에 대한 억제율 보다 감소하는 경향을 보였다. 병원균을 6시간 동안 배양한 후에 살균제를 처리하였을 때, propineb는 17.7%만 균사의 생육을 억제할 정도로 억제율이 저조하였지만, iminoctadine과 fluazinam은 분생포자를 집중함과 동시에 처리한 처리구와 비슷한 억제율을 보였다.

실험에 사용한 6종의 스테롤 생합성 저해 살균제들의 병원균의 흡광도에 대한 억제율은 보호용 살균제

보다 떨어지는 경향을 보였다(그림 5). 6종의 살균제 모두 6.25  $\mu\text{g/mL}$ 에서의 억제율은 매우 저조하였다. 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서 hexaconazole, tebuconazole, myclobutanil 등은 처리한 살균제를 세척할 경우 propineb, iminoctadine, fluazinam 등의 보호용 살균제의 억제 경향과 같이 효과가 감소하였다. Nuarimol의 경우는 특이하게 억제율은 미미하였지만 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서 포자 부착의 억제율이 54.7%로 세 처리구 중에서 가장 우수하였다. 그러나 6.25  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 처리한 nuarimol을 세척함으로써 포자 부착에 대한 억제 효과는 전혀 보이지 않았고, 포자 발아와 균사 성장 억제 효과보다 감소하는 경향을 보였다.

Kresoxim-methyl의 6.25  $\mu\text{g/mL}$  처리구에서는 포자의 발아와 부착 및 균사 성장에 대한 억제 효과에는 통계적인 유의성이 없었다. 그러나 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 포자 부착에 대한 억제 효과가 다른 어떤 살균제보다

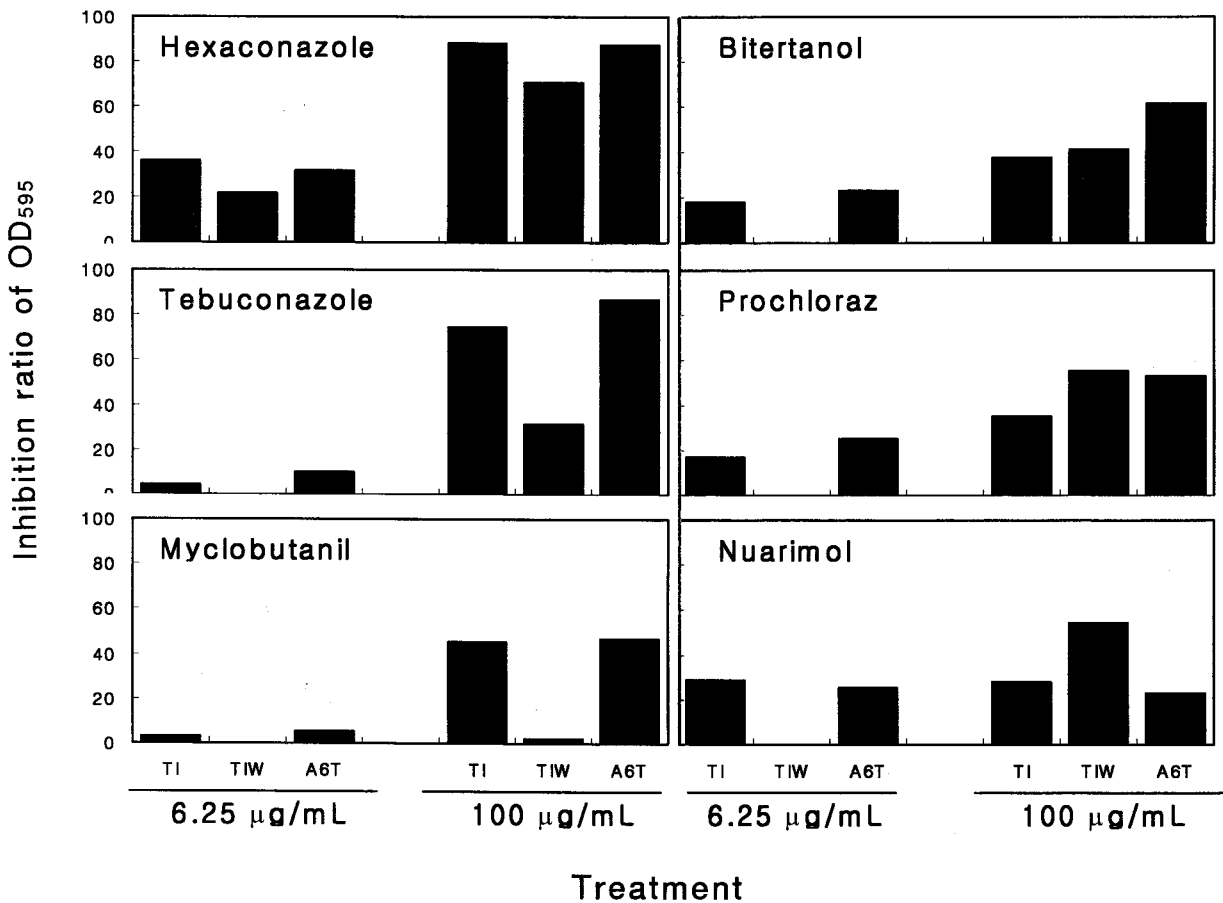


Fig. 5. The effect of 6 fungicides inhibiting sterol biosynthesis on spore germination, adhesion and mycelial growth of *Colletotrichum* sp. JC24 by microtiter plate assay. For the assessment of fungicidal activity, fungicides were treated at inoculation of JC24 immediately (TI), after incubation for 6 hrs (A6T), and following washing fungicides 2 hrs after incubation (TIW), respectively.

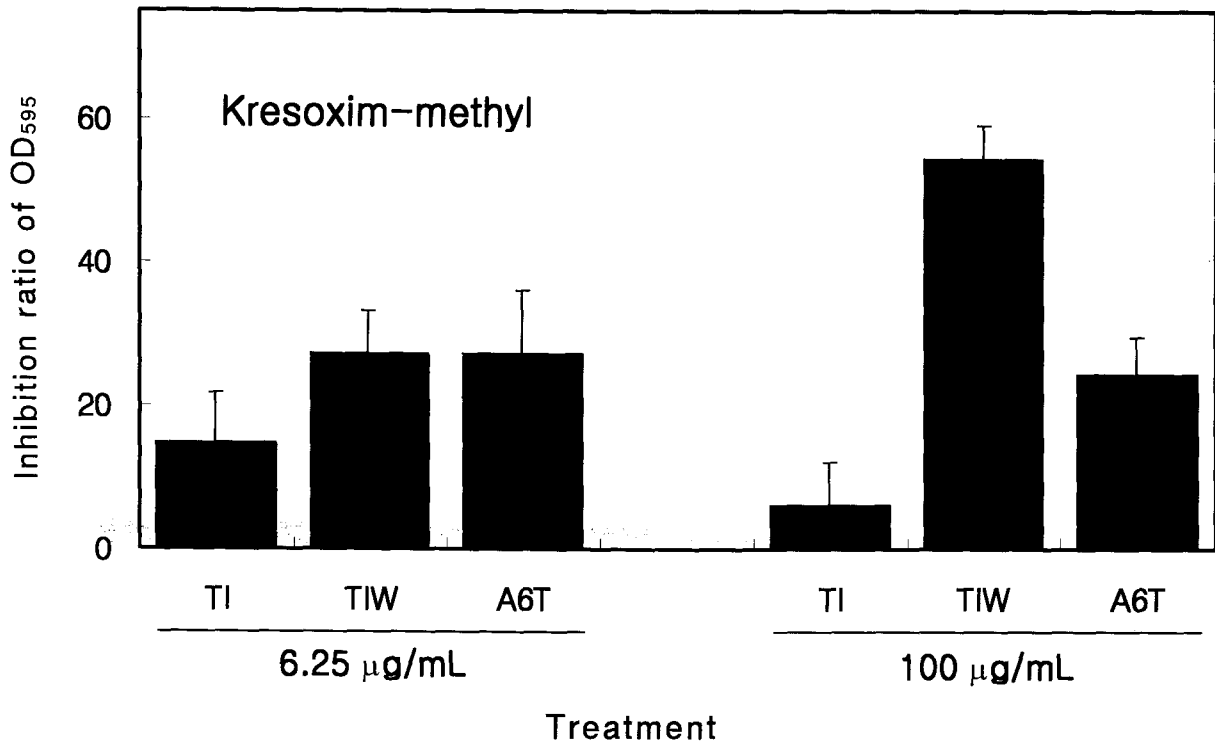


Fig. 6. The effect of kresoxim-methyl on spore germination, adhesion and mycelial growth of *Colletotrichum* sp. JC24 by microtiter plate assay. Fungicides dissolved with DMSO were treated at inoculation of JC24 immediately (TI), after incubation for 6 hrs (A6T), and following washing fungicides 2 hrs after incubation (TIW), respectively. The final concentration of DMSO was adjusted at about 1%.

크게 나타났는데, 포자 발아에 대한 흡광도의 억제율이 6.2%에 지나지 않았던 반면에, 포자의 부착에 대한 억제율은 54.4%로 실험한 모든 살균제 중에서 가장 높았다(그림 6).

### 고찰

본 실험에서 최 등(1999)의 microtiter plate assay 방법과 MTT와 propanol을 처리하여 병원균의 흡광도를 측정하는 Freimoser 등(1999)의 방법을 개선함으로써 고추 탄저병균에 대하여 다양한 화합물의 살균 활성을 측정할 수 있게 되었다고 생각한다.

Microtiter plate assay 방법을 사용하여 다수의 화합물의 살균활성을 측정할 때, 단순히 포자 발아와 균사 생장에 대한 억제 효과만을 측정한다면 특이적인 활성을 지니고 있는 화합물을 선별하지 못하는 경우가 생길 수도 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 Slawecki 등(2002)은 96 well microtiter plate에서 *Botrytis*와 *Puccinia*의 포자 부착에 대한 몇 종류 살균

제의 억제 효과를 조사하였다. 병원균의 포자를  $1 \times 10^5$  개/mL로 접종한 microtiter plate에 살균제를 처리하고 25°C에서 배양한 후, 바닥에 강하게 털어 부착하지 못한 포자를 제거하였다. 부착한 포자는 포유류의 cytotoxicity assay에 사용되는 sulforhodamine B를 이용하여 포자의 단백질 양을 조사함으로써 부착한 포자를 정량화 하였다(Skehan 등, 1990). 그러나 그 과정이 MTT와 propanol을 사용하는 Freimoser 등(1999)의 방법에 비교하면 복잡하기 때문에 다수의 화합물을 검정하기에는 적합하지 않은 것으로 판단하여, 본 실험에서는 Freimoser 등의 방법을 개선하여 사용하였는데, 고추 탄저병균을 96 well microtiter plate에 접종할 때, 화합물의 처리 시기를 달리함으로써 병원균이 기주식물을 침입하는 초기에 보여주는 여러 가지의 형태 분화에 대한 화합물의 활성 여부를 검정할 수 있었다. 최 등(1999)은 *in vitro*에서의 여러 가지 방법으로 *Botrytis cinerea*에 대한 sulphamide계와 dicarboximide계 살균제의 포자 발아와 균사 생장 억제 효과를 조사하였는데, microtiter plate 방법에서 살균제를

처리하는 방법을 달리 함으로써 간단하게 각 살균제의 작용 특성을 알 수 있었다고 보고하였다. 그들은 병원균을 접종함과 동시에 살균제를 처리하고 3시간 배양한 후 새로운 배지로 세척하는 방법(I)과 병원균을 접종한 후 6시간 배양한 다음 살균제를 처리하는 방법(II)을 사용하였는데, 방법 I과 II에서 얻은 결과가 포자 발아와 균사 생장에 대한 억제 실험에서 얻은 결과와 유사한 경향을 보였다고 보고하였다. 본 실험에서는 두 가지의 연구 결과를 이용하여 JC24를 접종함과 동시에, 또는 접종하고 6시간 배양한 후에 살균제를 처리하여, 분생 포자의 발아와 균사 생장 억제 효과를 검정할 수 있었다. 또한 병원균을 접종하면서 살균제를 처리하여 2시간 동안 배양한 다음, 새로운 배지로 2회 세척하여 살균제와 부착하지 않은 병원균의 포자를 제거하고 새로운 배지를 보충하여 배양함으로써, 병원균 포자의 부착을 저해하는 살균제의 효과를 구할 수 있었다. 이상의 방법으로 고추 탄저병 방제용 살균제를 실험한 결과, 본 실험 방법은 다양한 기작을 지니는 다수의 화합물의 살균 활성을 검정하는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각하였다.

Microtiter plate assay 방법에서 고추 탄저병균(JC24)의 생장 정도를 정량적으로 측정하기 위해서는 12시간의 MTT의 처리와 1시간의 propanol 처리가 필요하였다. 그러나 그림 1에서 보는 바와 같이  $1 \times 10^6$  개/mL로 접종하였을 때는 MTT의 단독 처리만으로도 무처리구보다 현저하게 흡광도가 증가하였고, MTT의 단독 처리와 MTT와 propanol 병행 처리의 흡광도 사이에는 유의성이 없었다. Microtiter plate의 한 well 당 JC24의 분생포자를  $1 \times 10^6$  개/mL로 접종하고 36시간 배양하면 그림 3에서 보는 것과 같이 JC24의 생장 곡선이 포화기에 해당하는데, 처리한 MTT가 산화되어 세포질 내부에서 formazan이 대량으로 생성되기 때문에 microtiter plate reader가 가지는 검출한계를 넘어서서, propanol의 처리에 의해서 세포로부터 추출되는 formazan의 흡광도를 정확하게 측정하지 못하는 것으로 생각된다. 따라서 microtiter plate assay 방법으로 고추 탄저병균(JC24)의 생육 정도를 측정하고자 할 때, MTT와 propanol을 동반 처리함으로써 병원균의 생장을 더욱 정량적으로 측정할 수 있으나, 접종하는 접종원의 포자 농도는 적정 농도로 조정해야할 필요가 있었다. 본 실험에서는 접종원의 농도를  $1 \times 10^5$  개/mL로 조절하는 것이 가장 효과적인 결과를 얻을 수 있었다.

Mancozeb, chlorothalonil, dithianon은  $6.25 \mu\text{g/mL}$ 에서 고추 탄저병균 분생포자의 발아와 부착, 그리고 균사 생장을 모두 억제하는 것을 보아 병원균의 초기 분화의 전단계에 강하게 작용하는 것을 알 수 있었다. 그림 4에서 보는 바와 같이 propineb, iminoctadine, fluazinam은 위의 세 가지 살균제보다 고추 탄저병균의 여러 가지 형태적 분화에 미치는 영향은 적은 것으로 나타났다. 특히 propineb는 병원균을 접종하고 바로 처리하였을 때를 제외하고는  $100 \mu\text{g/mL}$ 의 처리구에서도 병원균에 대한 억제 효과가 저조하였다. 이 결과는 propineb는 병원균의 균사 생육이나 포자 부착보다는 포자 발아에 더 큰 영향을 미치고 있다는 것을 보여준다. 6종의 보호용 살균제는 살균 활성의 강도와 특징에 따라서 두 그룹으로 나눌 수 있었는데, propineb, iminoctadine, fluazinam은 JC24의 분생포자를 접종함과 동시에 2시간 동안 처리하고 새로운 배지로 세척할 경우, 다른 두 처리보다 그 효과가 감소하였다. Mancozeb, chlorothalonil, dithianon과 같은 다른 3종의 살균제들도  $6.25 \mu\text{g/mL}$  이하의 농도로 처리하고 2시간 후에 세척하여 JC24의 포자 부착에 미치는 효과를 검사한 결과, 억제율이 감소하는 것을 보아 포자의 부착만을 특이적으로 억제하는 효과는 부족한 것으로 생각되었다(결과 미발표). 스테롤 생합성 저해 살균제들은 보호용 살균제보다 활성이 미미하게 나타났는데,  $100 \mu\text{g/mL}$ 의 처리구에서조차 hexaconazole과 tebuconazole을 제외한 다른 살균제들의 포자 발아와 균사 생장 억제 효과는 모두 60% 미만이었다(그림 5). 일반적으로 식물 병원균의 스테롤 생합성을 억제하는 살균제는 포자의 발아보다는 균사의 생장을 크게 억제하는 것으로 알려져 있다(Sherald 등, 1973; Buchenauer, 1987). 그림 5에서 보는 바와 같이 bitertanol과 prochloraz는  $100 \mu\text{g/mL}$ 에서 균사 생장의 효과가 다른 효과보다 높게 나타난 반면에, hexaconazole, tebuconazole, myclobutanil에서는 포자 발아와 균사 생장에 대한 억제 효과가 대등하였다. Hexaconazole을 비롯한 세 가지의 살균제에서 포자 발아와 균사 생장 억제 효과가 비슷하였던 것은 본 실험에서 포자 발아에 대한 억제 효과를 알아보기 위해서 병원균을 접종하면서 살균제를 처리하고 계속 배양하기 때문에 포자 발아에 대한 억제 효과와 균사 생장에 대한 억제 효과를 엄격하게 구별할 수 없었던 한계에서 나온 결과라고 본다.



그러나 군사 생장 억제 효과는 병원균을 6시간 배양하고 처리하였기 때문에 군사생장만을 억제하는 효과를 구할 수 있었다고 생각한다. 따라서 포자를 접종하면서 hexaconazole, tebuconazole, myclobutanil과 같은 살균제를 동시에 처리한 처리구에 대해서는 현미경에서 포자의 형태를 관찰하여, 포자 발아에 대한 억제 효과를 정확하게 판단할 수 있을 것으로 생각한다. Nuarimol의 100  $\mu\text{g/mL}$  처리구에서 살균제를 세척할 경우 포자의 부착에 대한 억제 효과가 상승하는 결과를 얻었지만, 6.25  $\mu\text{g/mL}$ 에서 100  $\mu\text{g/mL}$ 와 대등한 포자 발아와 군사 생장 억제 효과를 보이면서도 부착을 억제하는 효과는 전혀 보이지 않았던 것을 보아 부착만을 특이적으로 억제한다고 보기는 어려웠다. 그러나 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서 보인 포자 부착 억제 효과에 대한 원인은 좀 더 규명해 보아야 할 것으로 생각한다.

Slaweck이 등(2002)은 호흡 저해 살균제로 보고된 kresoxim-methyl이 *B. cinerea*와 *P. recondita*의 포자 부착을 억제한다고 보고하였다. 본 실험에서도 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 kresoxim-methyl의 처리는 포자 발아나 군사 생장보다는 포자의 부착을 특이적으로 억제하는 것을 알 수 있었다. Kresoxim-methyl은 고추 탄저병균의 호흡과정 중에서 cytochrome bc<sub>1</sub> complex의 활성을 억제하는데, 이 과정에서 병원균이 대체 호흡 경로(alternative respiration pathway)를 작동하기 때문에 *in vitro* 실험에서는 억제 효과가 포자에서의 결과와는 다르게 매우 저조한 것으로 보고되어 있다(Ypema와 Gold, 1999). 따라서 본 실험에서 포자 발아와 군사 생장 억제 효과가 미미한 것은 기존의 보고와 부합하는 결과로 생각한다. 그러면서도 포자가 microtiter plate의 표면에 부착하는 것을 억제하는 효과가 다른 효과보다 크게 나타난 것은 kresoxim-methyl이 포자 부착의 과정에 영향을 주고 있다는 증거이다. Doss 등(1993)에 의하면 중요한 식물병원균의 하나인 *B. cinerea*의 분생 포자 부착은 초기 부착과 후기 부착으로 나눌 수 있다. 초기의 부착에서는 건조한 분생 포자가 수화되면서 소수성인 표면에 약한 부착력으로 짧은 시간(약 2 분 이내) 안에 부착하지만, 기질 위에서 수 시간 배양된 후에 발생하는 후기의 부착에서는 포자가 발아관을 내며 부착하기 때문에 기질 표면의 소수성과는 관계없이 발아관 주변에 다당류의 물질을 분비하며 매우 강하게 부착하게 된다(Doss 등, 1995). Kresoxim-methyl이 *Colletotrichum* sp. JC24의 포자 부착을 억제하는 것은 JC24의 포자가 발아하기 전의 초

기 단계 부착을 억제하는 것으로 생각된다.

고추 탄저병균(JC24)을 이용하여 수행한 본 연구를 통하여 다양한 작용 특성을 지닌 화합물에 대한 대량 검정 방법을 확립할 수 있었다. 또한 확립한 검정법을 이용하여 기존의 살균제의 살균 활성을 조사한 결과, 활성의 강도와 특징을 가지고서 보호용 살균제와 스테롤 생합성 저해 살균제를 두 그룹으로 분류할 수 있었으며, 포자의 부착을 특이적으로 억제하는 kresoxim-methyl의 특성을 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

이 연구는 2002년도 농림부에서 시행하는 농림기술 개발연구사업(연구과제 번호: 202143-3)의 연구비 지원으로 수행된 연구 결과의 일부이며 지원에 감사드립니다.

## 인용 문헌

- Buchenauer, H. (1987) Mechanism of action of triazolyl fungicides and related compounds. pp.205~231, *In* Modern selective fungicides : properties, applications, mechanisms of action (ed. H. Lyr), Longman Scientific and Technical, Harlow, United Kingdom.
- Cornrod, J. C. and T. R. Hawkes (1995) Screening practices in the agricultural industry. pp.97~107, *In* Brighton crop protection conference -Weeds- 1995, England.
- Doss, R. P., S. W. Potter, G. A. Chastagner and J. K. Christian (1993) Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1786~1791.
- Doss, R. P., S. W. Potter, A. H. Soeldner, J. K. Christian and L. E. Fukunaga (1993) Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:260~265.
- Freimoser, F. M., C. A. Jakob, M. Aebi and U. Tuor (1999) The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3727~3729.
- Sherald, J. L., N. N. Ragsdale and H. D. Sisler (1973)

- Similarities between the systemic fungicides triforine and triarimol. Pestic. Sci. 4:719~728.
- Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney and M. R. Boyd (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J. Natl. Cancer Inst. 82:1107~1112.
- Slawewski, R. A., E. P. Ryan and D. H. Young (2002) Novel fungitoxicity assays for inhibition of germination-associated adhesion of *Botrytis cinerea* and *Puccinia recondita* spores. Appl. Environ. Microbiol. 68:597~601.
- Ypema, H. L. and R. E. Gold (1999) Kresoxim-methyl, modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. Plant Dis. 83:4~19.
- Wedge, D. E. and B. J. Smith (2000) A microtiter assay shows effectiveness of a natural fungicide for control of *Colletotrichum* spp. Phytopathology 90:S83.
- 손미정, 김홍태, 김진철, 최경자, 조광연 (1999) 고추 탄저병균의 실험실 내의 스크리닝법 확립. p.43, 학술발표회 요약집 1999, 한국농약과학회.
- 조광연 (1990) 신규 농약 개발을 위한 스크리닝 체제 확대 발전. 한국화학연구원 보고서.
- 최경자, 김진철, 김홍태, 조광연 (2000) *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 효율적인 호흡 저해제 검정법. 한국농약과학회지 4:52~59.
- 최경자, 김홍태, 김진철, 조광연 (1999) 여러 종류의 *in vitro* 생물 검정에서 *Botrytis cinerea*에 대한 sulphamide계와 dicarboximide계 살균제의 활성 특성. 한국농약과학회지 3:37~44.

---

**Development of assay method for the activities of new compounds, and the effect of several fungicides against spore germination, adhesion, and mycelial growth of *Colletotrichum* sp. causing red pepper anthracnose**

Jae Jeung Kim, Joon Tae Kim, Sung Woo Park, Eun Suk Park and Heung Tae Kim\* (Department of Agricultural Biology, Chungbuk National University)

**Abstract :** With microtiter plate, the assay method was developed for detecting the fungicidal activity of new compounds against spore germination, spore adhesion and mycelial growth of *Colletotrichum* sp. JC24 causing red pepper anthracnose. Also, the effects of some commercialized fungicides on fungal development like above mentioned were investigated by measuring the optical density of mycelia grown into wells of microtiter plate. For the standardization of assay method, some factors, such as the treatment of MTT and/or propanol, inoculum density and incubation period, affecting on mycelial optical density were investigated. For obtaining precise and consistent mycelial optical density, it was necessary the treatment of MTT for 12 hrs and propanol for 1 hr. inoculum density adjusted to  $1 \times 10^5$  spores/mL and incubation period for 36 hrs at 25°C. For fungicidal activities, 6 protective fungicides, 6 ones inhibiting sterol biosynthesis, and one inhibiting respiration were used in this study. While mancozeb, chlorothalonil and dithianon among 6 protective fungicides inhibited strongly spore germination, adhesion, and mycelial growth at 6.25  $\mu$ g/mL, propineb, iminoctadine and fluazinam inhibited intermediately spore germination and mycelial growth at 100  $\mu$ g/mL. Washing above 3 fungicides with new PD broth, their activity against spore adhesion decreased. With hexaconazole, tebuconazole and myclobutanil, the tendency of the activity against fungal differentiation of the early infection stage was similar to the latter group of protective fungicides, showing the decrease of the inhibitory activity against spore adhesion by washing 2 hrs after incubation. However, kresoxim-methyl inhibited spore adhesion distinctly, depending on the applied concentrations. Based on these results, it might be able to assess the fungicidal activity of many compounds against spore germination, adhesion and mycelial growth by the use of microtiter plate *in vitro*. Using the assay developed in this report, it was possible to investigate the inhibitory activity of some commercialized fungicides, too.

---

\*Corresponding author (Fax : 82-43-271-4414, E-mail : htkim@chungbuk.ac.kr)