

## 진균 세포벽 유래 신물질을 이용한 감자의 전신적 획득저항성 유도

박해준<sup>1\*</sup> · 김홍기<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(주)바이오드림스, <sup>2</sup>충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

### A Natural Fungus-derived Elicitor for Induction of Systemic Acquired Resistance (SAR) in Potato

Hae-Jun Park<sup>1\*</sup> and Hong Gi Kim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biodreams Co. Ltd., BVC 204, KRIBB, Daejeon 305-333, Korea

<sup>2</sup>Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received March 16, 2007)

**ABSTRACT:** It was investigated that systemic acquired resistance (SAR) was induced in plant treated with a elicitor, which was derived from a non-virulent fungus. The elicitor, a hyphal cell wall component derived from fungus, induced a production of phytoalexin and a generation of reactive oxygen species (ROS) in potato treated with its low level concentrations. The effect of the fungus-derived elicitor was better than that of virulent pathogen-derived elicitor, which was well known in potato. These results, therefore, suggested potential use of fungus-derived elicitor as a new plant protector for commercial development.

**KEYWORDS:** Elicitor, Fungus, Potato, Oxidative burst

식물에서 면역반응이라고 할 수 있는 유도저항성반응은 비병원성 균의 접종이나 엘리시터 물질 처리에 의해서 순간적으로 다량 발생하는 활성 산소 생성(oxidative burst)에 의해 유도된다(Doke, 1983a, b). 이어 보고된 많은 연구결과들은 식물이 병원체를 인식하여 자기 자신을 방어하기 위한 초기 정보전달기구로서 활성산소를 이용하고 있다고 보고 하고 있다(Doke *et al.*, 1996; Mehdy, 1994). 즉 병원체 인식에 의해 유도되는 활성산소생성이 과민성 반응(hypersensitive reaction), 병발생과정(pathogenesis related)-유전자발현, 항균물질생성, 리그닌화 및 식물세포벽의 교차화 등을 유도하기 위한 초기 신호가 되어 병원균으로부터 자신을 방어하는데 중요한 역할을 담당하고 있다고 하였다(Doke *et al.*, 1995; Jab *et al.*, 1997; Saikia *et al.*, 2006). 위와 같이 식물에서 일련의 저항성 반응을 유도하는 물질을 엘리시터라고 한다. 비병원성 균의 감염이나 엘리시터 처리에 의해 식물에서 발생하는 국부적인 활성 산소 생성은 전신유도저항성의 발현을 위한 초기신호로서도 작용한다. 이와 같이 식물이 자기 자신을 방어하기 위하여 초기에 생성하는 활성산소는 식물의 세포막에 존재하는 NADPH oxidase에 의해 생성된다고 알려져 있다(Doke, 1985; Yoshioka *et al.*, 2001).

지난 십 수년간 기주에 유도저항성을 유도할 수 있는 다양한 식물생장촉진 근권세균(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)이 분리되었으며, 이 중에서 식물체에 저항성을 부여하는 세균으로는 형광성 *Pseudomonas* 속과 *Bacillus* 속 세균이 유용한 것으로 알려져 왔다. 비록 생물적 방제수단으로써 이들 세균의 유용성이 인정되어 왔으나 유도저항성에 대한 정확한 기작은 완전히 밝혀져 있지 않다(van Loon *et al.*, 1998). 이와 관련하여, 병원성균을 접종시킨 카네이션에 PGPR을 처리하는 경우 식물체에 항균물질인 파이토알렉신이 축적되며, 오이에 PGPR을 처리했을 때 전신유도 저항성이 유도됨이 알려져 있다. 최근에는 *Bacillus*속균을 오이식물의 근권에 처리하였을 때 유도저항성 반응이 유도되었다고 보고 되어 있다(Park *et al.*, 2001).

이러한 식물의 유도저항성은 근권세균과 같은 세균류 뿐만 아니라 많은 비병원성 진균류에 의해서도 유도된다(Doke, 1983b). 감자 역병균의 비병원성 race가 접종된 감자에서 활성산소 생성, 파이토알렉신 및 PR-단백질 유도 등 일련의 유도저항성 반응이 나타났고 이는 새로운 개념의 식물병 방제제의 개발에 응용되고 있다(Yoshioka *et al.*, 1996).

한편, 감자 역병균(*Phytophthora infestans*)에서 추출한 세포벽물질 처리에 의해서도 같은 현상이 유도된다고 보고되어 있다(Chai and Doke, 1987; Doke, 1983a; Yoshioka

\*Corresponding author <E-mail: sarpark@hanmail.net>

et al., 2001). 그 이후 여러 식물병원균의 세포벽물질을 분리하여 대상 식물에 처리할 경우 유도저항성이 높은 활성을 갖고 유도된다는 것이 밝혀졌다(Brisson et al., 1994). 아울러 비병원성 세균이나 진균류에서 분비하는 물질 역시 대상 식물에 처리하였을 경우에도 같은 현상이 일어난다(Baker et al., 1993; Kamoun et al., 1998). 그러나 이들 엘리시터의 경우 원재료가 되는 미생물들이 배양조건이 까다롭거나 증식량과 수율이 높지 않아 현실적으로 경제적 가치가 떨어진다. 그러므로 식물병 방제제로서의 우수한 잠재력에도 불구하고 엘리시터가 크게 주목받고 있지 못하고 있는 실정이다.

본 연구에서는 이러한 기존의 엘리시터의 단점을 보완하기 위하여 자연계에서 존재하는 진균들 중에서 배양이 용이하고 수율성이 높을 뿐 만 아니라 유도저항성을 효과적으로 발현시킬 수 있는 균류를 예의 탐색하여 이들로부터 분리한 세포벽물질을 처리한 식물에서 유도저항성발현여부를 검정해 본 결과, 유도저항성이 매우 효율적으로 유도됨을 발견하여 보고하고 새로운 방제제로서의 가능성을 타진하였다.

## 재료 및 방법

### 엘리시터 제작

한국생명공학연구원(KCTC)에서 분양받은 진균류인 KCTC 1002BP를 사용하였다. 이 균주는 아직 정확한 분류동정이 이루어지지 않았다. 분양받은 KCTC 1002BP 균주를 Rye배지에 25°C에서 3일간 배양하여 균사를 회수한 다음 Doke와 Tomiyama(1980)의 방법에 따라 세포벽물질을 추출하여 엘리시터를 제조하였다.

### 유도저항성 검정

활성산소측정은 Miura et al.(1993)이 제시한 루미놀테스트방법에 의해 이루어 졌으며 항균물질 측정은 Noritake et al.(1994)의 방법에 의해 감자의 파이토알렉신인 리시친과 루비딘의 유도를 관찰하였다. 유도저항성을 검정하기 위한 식물재료는 식용으로 널리 재배되고 있는 감자(품종: 수미)의 괴경으로, 본 괴경은 수확한지 2~3개월 지난 것을 사용하였다.

### 접종원 준비

감자역병균(*Phytophthora infestans*)을 감자괴경에 접종시킨 5일 후 괴경으로부터 균사를 회수하여 증류수에 희석한 다음 유주자낭을 채취하였다. 채취한 유주자낭을 증류수에 희석하여 2시간 동안 10°C에 정치하여 유주자를 나출시켜  $1 \times 10^4$  cfu/ml 농도에 맞춰 접종원으로 사용하였다.

## 결과 및 고찰

균주의 세포벽 성분이 엘리시터로써 식물체에 유도 저

항성을 일으키는 지 검정하기 위하여 세포벽성분 용액을 감자 괴경조직에 처리하여 먼저 식물의 유도저항성 반응의 초기신호물질인 활성산소가 그 조직에서 어느 정도 생성되는 지를 측정하였다. 대조구로서 현재까지 감자에 대하여 유도저항성의 유도효과가 우수한 것으로 알려진 감자역병균(*Phytophthora infestans*) 세포벽으로부터 분리하여 동일한 방법으로 만들어진 엘리시터 용액을 준비하여 처리하였다. 활성산소의 측정은 재료 및 방법에서 제시한 대로 루미놀 화학발광법에 의해 진행하였다. 균주의 세포벽 성분 엘리시터 용액을 농도 별로 처리한 경우 1  $\mu$ g/ml 처리구에서도 강력한 루미놀화학발광 반응이 포착되었으므로 상기 농도의 엘리시터 처리에 의해 다량의 활성산소 생성이 유도됨을 알 수 있었다(Fig. 1a). 대조구로 사용한 감자역병균 엘리시터 용액은 0.1~1 mg/ml에서 활성산소 생성이 유도된다고 알려져 있으므로(Miura et al., 1995; Park et al., 2001) 10  $\mu$ g/ml 농도처리에서 대조용액구와 비교해 본 결과 본 균주에서 유래한 엘리시터 용액처리구만이 강력한 루미놀 화학발광반응을 보였고 대조용액구에서는 미약한 반응이 나타났다(Fig. 1b). 이는 기존의 병원성 균으로부터 유래한 엘리시터 뿐만 아니라 다른 자연계에서 존재하는 비병원균주에서도 경우에 따라서는 엘리시터를 제작할 수 있음을 시사하며, 100배 정도 낮은 농도에서도 강한 유도저항성반응을 보이므로 더 우수한 엘리시터를 발견할 수 있다는 것을 시사하기도 한다.

식물에서 유도 저항성반응을 위해 생성되는 활성산소는 NADPH oxidase에 의해 활성화된다(Yoshioka et al., 2001). 본 엘리시터에 의해서도 같은 메카니즘에 의해서 활성산소생성이 유도되는 가를 확인하기 위하여 NADPH oxidase의 저해제인 0.1 mM의 DPI(dibenziodolium chloride) 용

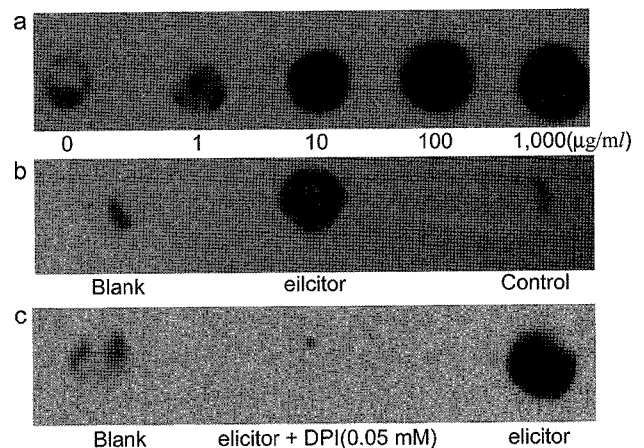
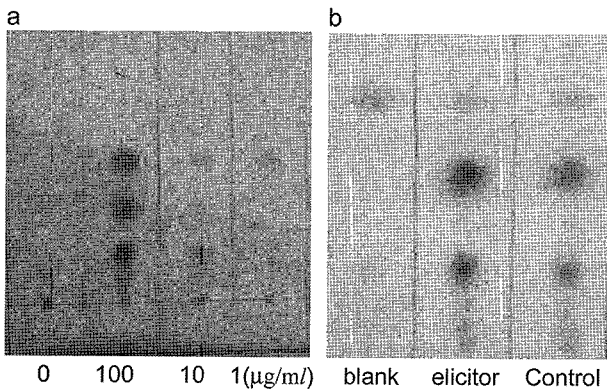


Fig. 1. Oxidative burst as images of luminol-mediated chemiluminescence on potato tuber discs. The potato tuber discs were treated with fungus-derived elicitor (a). Blank: 10 mM, Tris-HCl buffer, pH 7.4, elicitor: 10  $\mu$ g/ml of the fungus-derived elicitor, Control; 10  $\mu$ g/ml of an virulent pathogen-derived elicitor. DPI (dibenziodolium chloride) is NADPH oxidase inhibitor.

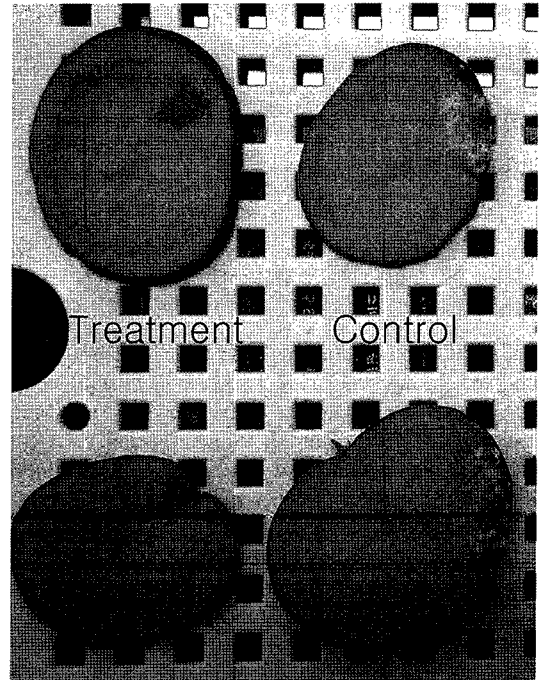
액을 본 엘리시터 용액에 첨가하여 효과를 검정한 결과, DPI가 첨가되는 경우, 실험 용액의 루미놀 화학발광 효과가 거의 상실됨을 알 수 있었다(Fig. 1c). 엘리시터나 세포벽 성분에 의해 유도되는 식물의 저항성 유도가 초기 식물의 세포막에 존재하는 NADPH oxidase를 기동하여 유도된다는 사실이 널리 알려져 있다(Doke, 1985; Doke and Miura, 1995; Yoshioka *et al.*, 2001). 이 결과에 의해 대상식물과 아무런 관련 없는 진균에서도 같은 메카니즘에 의해 활성 산소생성이 유도됨을 알 수 있었다. 따라서 이 진균(KCTC 1002BP)을 적절히 활용한다면 화학농약을 사용하지 않고도 효과적인 식물병 방제가 가능할 것으로 판단된다.

위와 같이 생성된 활성산소는 유도저항성 반응의 일환으로 알려져 있는 파이토알렉신 항균물질을 생성하게 한다고 보고 되어 있다(Noritake *et al.*, 1996; Yoshioka *et al.*, 2001). 그러므로 파이토알렉신의 생성과의 관계를 검증하기 위하여 본 엘리시터를 감자 괴경에 처리하여 확인해본 결과 1 µg/ml의 아주 낮은 농도에서 파이토알렉신의 일종인 루비민 과 리시틴이 상당량 유도됨을 알 수 있었다(Fig. 2a). 아울러 상기 대조구 엘리시터와 파이토알렉신 유도 능력을 비교하기 위하여 각각 100 µg/ml 농도의 실험용액과 대조구용액의 처리에 따른 파이토알렉신의 유도 효과를 TLC 실험을 통해 비교하였다(Fig. 2b). 그 결과 본 균주의 엘리시터용액이 같은 농도의 대조구용액보다 많은 양의 파이토알렉신을 유도함이 확인되었다.

식물체에 직접 유도저항성의 유도 여부를 확인하기 위하여 감자괴경을 절단 한 다음 본 균주로부터 제작한 엘리시터를 1 µg/ml 농도로 절단면에 고르게 도말 한 3일 후 준비된 감자역병균을 접종하였다. Fig. 3에 제시한 바와 같이 엘리시터 처리구에서는 감자역병균이 전혀 자라지 못한 반면 비처리구에서는 기증균사가 자라 증식됨을



**Fig. 2.** Induction of phytoalexin production in potato tuber by a nature fungi-derived elicitor. The potato tuber discs were treated with fungus-derived elicitor (a). Blank: 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, elicitor: 100 µg/ml of the fungus-derived elicitor, Control; 100 µg/ml of an virulent pathogen-derived elicitor.



**Fig. 3.** Induction of systemic acquired resistance in potato tuber was treated with elicitor. The potato tuber discs were treated with 10 µg/ml of fungus-derived elicitor (Treatment) or 10 mM, Tris-HCl buffer, pH 7.4 (Control). Experimental conditions were described by method.

알 수 있었다(Fig. 3).

따라서 KCTC 1002BP 균주에서 분리된 세포벽물질은 아주 낮은 농도에서 식물체의 유도저항성을 효과적으로 유도할 수 있고, 나아가 본 균주는 생장속도가 빠르고 배양이 용이하여 상업화를 하였을 경우 경제적 가치가 높을 것으로 판단된다. 그러므로 본 엘리시터 물질을 이용하게 되면 각종 식물에 대해 저렴하고 안전하게 유도저항성 기능을 부여하고, 신개념의 식물병 방제제 개발에 기여하리라고 생각된다. 이를 위해 앞으로 각종식물에 대해서 유도저항성 유도 스펙트럼을 작성하여야 하며 선발된 균주의 명확한 동정 연구가 진행하여야만 하겠다.

### 적 요

식물에 대해 병원성균이 아닌 자연계에서 존재하는 진균류로 부터 세포벽 성분을 분리하여 식물의 유도 저항성을 유도하는 엘리시터로서의 가능성을 시험하였다. 그 결과 선발된 진균 세포벽 성분이 감자에서 종래 알려진 어떤 엘리시터 보다도 아주 낮은 농도처리에서도 활성산소와 파이토알렉신 생성을 다량 유도하였다. 뿐만 아니라 감자괴경을 이용한 병저항성 생물검정에서도 우수한 유도저항성이 발현되었음을 확인하였다. 그러므로 자연에서 분리된 일반적인 균주의 세포벽물질 엘리시터도 식물체의 유도저항성을 효과적으로 유도할 수 있는 새로운 식물병

방제제로서의 개발 가능성이 있음을 시사하였다.

### 감사의 말씀

본 연구는 과학기술부 연구성과지원사업의 연구비 지원으로 수행된 연구로 이에 감사를 드립니다.

### 참고문헌

- Baker, C. J., Orlandi, E. W. and Mock, N. M. 1993. Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cell. *Plant Physiol.* **102**: 1341-1344.
- Brisson, L. F., Tehaken, R. and Lamb, C. J. 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* **6**: 1703-1712.
- Chai, H. B. and Doke, N. Superoxide anion generation; A response of potato leaves to infection with *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* **77**: 645-649.
- Doke, N. 1983a. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol. Plant Pathol.* **23**: 345-357.
- Doke, N. 1983b. Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts upon the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* **23**: 359-367.
- Doke, N. 1985. NADPH-dependent  $O_2^-$  generation in membrane fraction isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Pathol.* **27**: 311-322.
- Doke, N. and Tomiyama, K. 1980. Effect of hyphal wall components from *Phytophthora infestans* on protoplasts of potato tuber tissues. *Physiol. Plant Pathol.* **16**: 169-176.
- Doke, N. and Miura, Y. 1995. *In vitro* activation of NADPH-dependent  $O_2^-$  generating system in a plasma membrane-rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an elicitor from *Phytophthora infestans* or with digitonin. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **46**: 17-28.
- Doke, N., Miura, Y., Sanchez, L. M., Park, H.-J., Noritake, T., Yoshioka, H. and Kawakita, K. 1996. The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence. *Gene* **179**: 45-51.
- Jabs, T., Tschope, M., Colling, C., Hahlbrock, K. and Scheel, D. 1997. Elicitor-stimulated ion fluxes and  $O_2^-$  from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4800-4805.
- Kamoun, S., van West, P., Vleeshouwers, V. G. A. A., de Groot, K. E. and Groveers, F. 1998. resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF 1. *Plant Cell* **10**: 1413-1425.
- Mehdy, M. C. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* **105**: 467-472.
- Miura, Y., Yoshioka, H. and Doke, N. 1995. An autophotographic determination of the active oxygen generation in potato tuber discs during hypersensitive response to fungal infection or elicitor. *Plant Sci.* **105**: 45-52.
- Noritake, T., Kawakita, K. and Doke, N. 1996. Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant Cell Physiol.* **37**: 113-116.
- Park, H.-J., Miura, Y., Kawakita, K., Yoshioka, H. and Doke, N. 1998. Physiological mechanisms of a sub-systemic oxidative burst triggered by elicitor-induced local oxidative burst in potato tuber slices. *Plant Cell Physiol.* **39**: 1218-1225.
- Park, K. S., Ahn, I. P. and Kim, C. H. 2001. systemic resistance and expression of the pathogenesis related genes mediated by the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* EXTN-1 against anthracnose disease in cucumber. *Mycobiology* **29**: 48-53.
- Price, A. H., Taylor, A., Ripley, S. J., Griffiths, A. Trewavas, A. J. and Knight, M. R. 1994. Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* **6**: 1301-1310.
- Sakia, R., Yadav, M., Varghese, S., Singh, B. P., Gogoi, D. K., Kumar, R. and Arora, D. K. 2006. Role of Riboflavin in induced resistance against *Fusarium* wilt and Charcoal rot diseases of Chickpea. *Plant Pathol. J.* **22**: 339-347.
- von Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**: 453-483.
- Yoshioka, H., Miyabe, M., Hayakawa, Y. and Doke, N. 1996. Expression of gene for phenylalanine ammonia-lyase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in aged potato tubers infected with *Phytophthora infestans*. *Plant Cell Physiol.* **37**: 81-90.
- Yoshioka, H., Sugie, K., Park, H.-J., Maeda, H., Tsuda, N., Kawakita, K. and Doke, N. 2001. Induction of plant gp91 phox homolog by fungal cell wall, arachidonic acid and salicylic acid in potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 725-736.