

고추 탄저병균(*Colletotrichum acutatum*)의 원형질체 형성과 원형질체를 이용한 살균제 효과 검정

김명기 · 김흥태*

충북대학교 농업생명환경대학 응용생명환경학부 식물의학전공

(2008년 1월 11일 접수, 2008년 3월 7일 수리)

Protoplast Formation of *Colletotrichum acutatum* and the Assessment of Antifungal Activity of Several by using its Protoplasts

Myoung Ki Kim and Heung Tae Kim*

Dept. of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

Abstract

To obtain protoplasts of *Colletotrichum acutatum* JC24, conidia were inoculated onto cellophane membrane placed on PDA and incubated at 25°C for 20 hrs under the dark condition. Cellophane membranes, where mycelia were incubated, were soaked into 2% lysing enzyme solution prepared with 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0) including 1.2 M sorbitol. After treatment in 2% enzyme solution for 2 - 3 hrs, it could be possible to harvest $2-3 \times 10^6$ protoplasts/mL. The effect of several fungicides on reversion ratio was determined by using the protoplasts obtained from *C. acutatum* JC24. Any protoplasts could not be reversed to mycelia on reversion PDA amended with 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of propineb. With tebuconazole, inhibition ratio of protoplast reversion was 100 and 0.9% at 0.5 and 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, while inhibitory effect on mycelial growth was 85.1 and 75.7%. The inhibitory tendency of carbendazim on protoplast reversion was as same as mycelial growth. In the case of strobilurins, trifloxystrobin and kresoxim-methyl, they only could inhibit protoplast reversion of *C. acutatum* JC24, when salicylhydroxamic acid (SHAM) was amended into reversion PDA with strobilurins.

Key words *Colletotrichum acutatum*, protoplast, fungicidal activities, strobilurins, salicylhydroxamic acid

서 론

국내에서 고추 탄저병균은 *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. coccodes*, *C. dematium*, *C. acutatum*, 그리고 완전세대인 *Glomerella cingulata* 등으로 알려져 있었다(Park과 Kim, 1992). 그러나 최근 들어 탄저병균 ITS 영역의 DNA 상동성 비교와 종 특이적인 primer를 이용한 PCR, 살균제에 대한 반응 등을 통하여 고추 탄저병균의 주된 병원균이 *C. acutatum*으로 변화되어 있음이 보고되었다(Kim 등, 2008). 탄저병은

7월 초순과 중순경부터 탄저병균이 고추의 열매를 침입하기 시작하여 병이 발생하기 시작하는데, 수확기인 8월과 9월을 지나면서 급격히 발생량이 증가한다. 고추 탄저병은 주로 열매에 발생하기 때문에 수량감소와 품질 저하에 직접적인 영향을 미쳐, 국내 총생산액의 10% 이상, 중국의 경우 약 18%의 수량 손실이 보고되었으며, 경우에 따라서는 50~80%까지 수량이 감소하기도 한다고 보고되어 있다(Kim과 Park, 1988; Shin 등, 1999). 이처럼 고추 농사에 있어서 큰 피해를 주는 탄저병을 방제하기 위해서는 살균제를 이용하는 화학적 방제가 많이 사용되고 있으나, 농약의 잔류 문제와 친환경 농산물에 대한 소비자의 관심 증가 등의 사회적 환경 변화는 살

*연락처 : Tel. +82-43-261-2556, Fax. +82-43-271-4414
E-mail: htkim@chungbuk.ac.kr

균제 사용의 자체를 요구하며 새로운 방제 방법의 개발을 요구하고 있는 실정이다. 새로운 방제 방법을 개발하기 위해서는 병원균의 생리, 생태, 유전에 대한 정보를 얻을 수 있어야 하는데, 아직까지 고추 탄저병균인 *Colletotrichum acutatum*에 대한 기반 지식이 부족한 상태이다. 최근 Talhinhos 등 (2008)은 *C. acutatum*의 병원성 유전자의 기능을 조사하기 위하여 ATMT법을 이용하여 다양한 돌연변이체를 획득 방법과 원형질체를 이용한 형질전환 방법을 확립하였다.

*Neurospora crassa*에서부터 시작된 사상균의 원형질체 연구는 사상균의 생리, 생화학 및 유전학 연구에 사용되고 있으며, 최근에는 식물병원균의 형질전환을 위해서 원형질체를 이용하기도 한다(Bachmann과 Bener, 1981; Harris, 1982; He 등, 2007). Ogawa 등(2000)은 식물병의 생물적 방제에 이용되는 *Trichoderma harzianum*의 원형질체 융합을 통하여 benomyl에 내성과 식물병원균에 대한 항균활성을 보이며 균사의 생육이 우수한 균주를 선발하여 생물적 방제의 효율을 상승시키기도 하였다. 또한 Teraoka 등(1992)은 cellulase와 driselase를 첨가한 배양 시스템을 이용하여 벼 도열병균으로부터 거대 원형질체를 생성시켰고, 이를 이용하여 살균제의 작용 기작 실험을 수행하였다. Kim 등(2001)도 거대 원형질체 생성 조건에서 *Rhizoctonia solani* AG4의 원형질체에 pencycuron을 처리하고 거대 원형질체의 형성에 영향을 주는지의 여부를 조사하여 pencycuron이 세포막에 작용하여 나타나는 부가적인 효과를 보고하기도 하였다. 이처럼 원형질체는 사상균의 생리 및 형질전환 연구뿐만 아니라 살균제 효과와 작용기작을 연구하는데도 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각한다.

따라서 본 연구에서는 고추 탄저병균인 *C. acutatum*의 유전체 기능과 실내에서의 살균제 효과와 작용 특성을 규명하기 위하여 효과적으로 원형질체를 획득할 수 있는 적합한 조건을 확립하고, 획득한 원형질체를 이용하여 탄저병 방제에 사용되는 살균제의 효과와 작용 특성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

사용한 병원균과 보관

병든 고추 열매에서 단포자 분리한 탄저병균 *Colletotrichum acutatum* JC24를 PDA에 접종하여 25°C의 암상태에서 7일간 배양하였다. 균총의 선단에서 직경 5 mm의 균사조각을 떼어내어 Cryotube™(직경; 12 mm, 높이; 48 mm)에 5조각씩 넣고, 1 mL의 멸균수를 넣어 상온에서 보관하였다. 실험

에 사용하고자 할 때에는 보관 중인 균주를 PDA에 접종하여 25°C의 PDA배지에서 7일간 배양한 후, 실험에 사용하였다.

Colletotrichum acutatum JC24의 원형질체 생성

C. acutatum JC24로부터 원형질체를 얻기 위하여, 25°C의 PDA에서 7일간 배양한 병원균의 균총에서 수확한 포자의 현탁액에서의 농도를 1×10^6 conidia/mL로 조정하였다. 멸균한 셀로판막을 멸균수로 2회 세척하여 PDA에 치상한 후, 포자 현탁액을 100 μ l씩 도말하고 25°C의 암 상태에서 정해진 시간동안 각각 배양하였다. 셀로판막에 배양된 균사체는 25°C의 세포벽 분해효소에 2시간 처리하여 원형질체를 생성시켰으며, 삼투압 안정제로 2회 세척하고 멸균된 4겹의 거즈로 여과한 이후, 실험에 사용하였다. 이상의 방법으로 균사체의 배양 시간, 세포벽 분해효소의 종류와 농도, 삼투압 안정제의 종류와 농도, buffer의 pH 등이 원형질체의 생성량에 미치는 영향을 조사하였다. 균사체는 25°C의 암상태에서 10, 15, 20시간 배양한 후, 수확하여 사용하였으며, 각각의 균사체에서 생성된 원형질체의 수를 조사하였다. 세포벽 분해효소로는 lysing enzyme(sigma No. L1412)과 driselase(sigma No. D9515)를 각각 0.5, 1, 2%로 사용하였으며, 삼투압 안정제로는 KCl과 mannitol, sorbitol을 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 M로 사용하였다. 실험에 사용한 0.02 M phosphate buffer의 pH를 결정하기 위하여 6.2, 7.0, 7.6으로 pH를 각각 조절하여 실험하고, 생성되는 원형질체의 양을 조사하였다.

C. acutatum JC24의 원형질체 재생

균사체로부터 수확한 원형질체는 삼투압 안정제인 sorbitol을 첨가한 PDA 재생배지에 도말하여 재생율을 조사하였다. PDA 재생 배지에 1×10^4 개/mL로 조정된 원형질체를 50 μ l씩 도말하고 25°C의 암상태에서 5일간 배양한 후 형성된 균총의 수를 조사하여 재생율을 계산하였다. 삼투압 안정제의 농도가 탄저병균의 원형질체 재생율에 미치는 효과를 비교하기 위하여 PDA 배지에 삼투압 안정제로 sorbitol을 각각 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 M씩 첨가하고 형성되는 콜로니 수를 비교하였다.

C. acutatum JC24의 원형질체 재생에 미치는 살균제 효과

탄저병균 원형질체의 재생에 미치는 효과를 조사하기 위하여 보호용 살균제인 propineb(a.i. 93%, 원제), ergostrol 생합성 저해제인 tebuconazole(a.i. 99%, 원제), β -tublin 생

합성 저해제인 carbendazim(a.i. 90%, 원제), carbendazim과 diethofencarb의 혼합제(a.i. 50%, WP), 호흡저해제인 trifloxystrobin(a.i. 22%, SC), kresoxim-methyl(a.i. 47%, WG) 등을 선발하여 실험하였다. 원형질체의 재생을 위해서 삼투압 안정제인 sorbitol을 첨가한 PDA배지에 선발한 살균제를 정해진 농도별로 첨가하고, 수확한 원형질체(1×10^4 개/mL)를 50 μ l씩 도말하였다. 재생 배지는 25°C의 암상태에서 5일간 배양한 후, 형성된 균총의 수를 조사하였다. 살균제가 탄저병균 원형질체 재생에 미치는 효과는 아래 식에서처럼 무처리 재생배지에서 형성된 균총 수에 대하여 살균제 처리 재생배지에서의 균총 수를 비교하여 조사하였다.

$$\text{균총생성 억제율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{살균제 배지에서의 균총수}}{\text{무처리 배지에서의 균총수}} \right) \times 100$$

실험에 사용한 6종의 살균제는 각각의 종류에 따라서 처리한 농도를 달리 하였는데, propineb는 재생배지에서의 최종농도가 10, 5, 1 μ g mL⁻¹가 되도록, tebuconazole은 0.5와 0.1 μ g mL⁻¹, carbendazim과 carbendazim/diethofencarb의 혼합제는 각각 100과 10 μ g mL⁻¹, trifloxystrobin과 kresoxim-methyl은 10과 1 μ g mL⁻¹가 되도록 재생 배지에 첨가하였다. 원제를 사용한 propineb, tebuconazole, carbendazim은 DMSO에 녹여 재생배지에 첨가하였으며, 배지에서의 최종농도는 1%로 맞추었다. 다른 살균제는 멸균수에 고루게 현탁하여 배지에 첨가하였다.

또한 호흡저해제인 trifloxystrobin과 kresoxim-methyl이 첨가된 재생배지에 SHAM을 같이 첨가하여 원형질체의 재생률에 미치는 두 살균제의 억제효과가 변화하는지의 여부를 조사하였다.

한천 희석법에 의한 살균제의 균사 성장 억제 실험.

위에서 선발한 살균제가 고추 탄저병균인 *Colletotrichum acutatum* JC24의 균사 성장에 미치는 억제 효과를 한천희석법으로 조사하였다. *Colletotrichum acutatum* JC24를 PDA에 접종하여 25°C의 암상태에서 7일 동안 배양하였고, 접종원으로 사용하기 위해서 동일한 조건에서 다시 한 번 배양하였다. 균총의 균사 선단에서 직경 5 mm의 균사 조각을 떼어 내어 각각의 살균제를 정해진 농도별로 첨가한 PDA 배지에 접종하였다. 병원균을 접종한 PDA는 25°C의 암조건에서 7일간 배양한 후 아래 공식에 의해서 균사 성장 억제율을 구하였다.

$$\text{균사 성장 억제율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{살균제 배지에서의 균총의 직경}}{\text{무처리 배지에서의 균총의 직경}} \right) \times 100$$

결 과

고추 탄저병균의 원형질체 생성

PDA 위의 셀로판막에서 20시간 배양한 균사체에 세포벽 분해효소를 처리하고 30분 후부터 Fig. 1에서 보는 것과 같이 직경 6.75 μ m의 원형질체가 형성되는 것을 관찰할 수 있었다. 세포벽 분해효소를 처리하는 시간이 길어짐에 따라서 원형질체의 크기도 증가하는 것을 알 수 있었다.

***C. acutatum* JC24의 원형질체 생성에 미치는 요인**

셀로판막 상에서 배양한 균사체의 배양 시간에 따른 원형질체 생성량을 조사하였다(Fig. 2). PDA에서 수확한 1×10^6 개/mL의 탄저병균의 포자를 100 μ l씩 도말한 셀로판막 한 장당 20시간 배양한 균사체에서 1.17×10^6 개/mL의 원형질체를 얻을 수 있었다. 셀로판막상에서 10시간 배양한 균사체에서는 생성되어 나온 원형질체를 확인하기가 어려웠다. 탄저병균의 원형질체 생성을 위해서 사용한 lysing enzyme과 driselase를 사용하였는데, Fig. 3에서 보는 것과 같이 driselase의 처리구에서는 원형질체가 전혀 생성되지 않았다. 그러나 lysing enzyme을 처리하였을 때에는 0.5%의 처리구에서 셀로판막 한 장당 1.5×10^4 개/mL의 원형질체를 얻을 수 있었다. Lysing enzyme의 처리 농도가 1%로 상승하면서 생성되는 원형질체

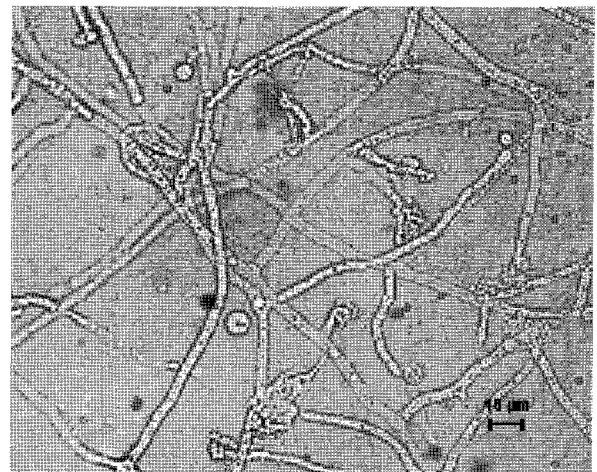


Fig. 1. Protoplast formation from mycelia of *Colletotrichum acutatum* JC24 30 min after treatment of enzyme solution. Conidia of *Colletotrichum acutatum* JC24 were inoculated on a cellophane membrane placed on a reversion PDA, and incubated at 25°C for 20 hrs under the dark condition.

의 수는 1.52×10^6 개/mL로 급격하게 상승하였으며, 2%를 처리하였을 때에는 1.98×10^6 개/mL로 상승하였다. 사용한 삼투압안정제와 그 농도가 원형질체의 생성에 미치는 효과는 Fig. 4와 같았다. 사용한 삼투압 안정제를 0.6 M 이하의 농도로 사용하였을 경우에는 생성되는 원형질체의 수가 6.5×10^4 개/mL로 매우 저조하였다. 그러나 KCl을 0.9 M로 조정하여 사용하였을 경우에는 1.58×10^6 개/mL로, 그 수가 급격하게 증가하였다. 모든 삼투압 안정제를 1.2 M로 처리하였을 경우에는, 사용한 KCl, mannitol, sorbitol 모두에서 1.70×10^6 개/mL 이상의 원형질체를 얻을 수 있었으며, 그 중에서 sorbitol의 경우가 2.37×10^6 개/mL로 가장 많은 원형질체를

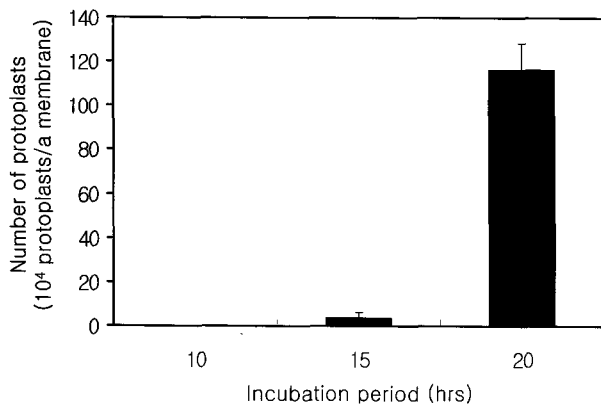


Fig. 2. Effect of mycelial incubation period on the protoplast formation of *Colletotrichum acutatum* JC24. Conidia of *C. acutatum* JC24 were inoculated onto cellophane membrane placed on PDA and incubated at 25°C for indicated incubation periods, respectively. Cellophane membranes were soaked into 2% lysing enzyme solution prepared with 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0) including 1.2 M of sorbitol.

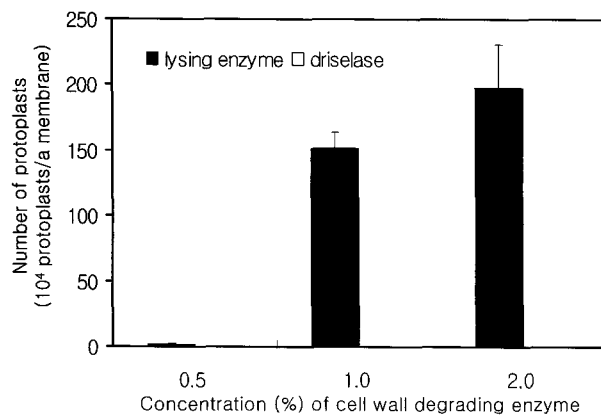


Fig. 3. Effect of enzymes and their concentrations on the protoplast formation of *Colletotrichum acutatum* JC24. Cellophane membranes, on which *C. acutatum* JC24 was incubated at 25°C for 20 hrs under the dark condition, were soaked into each enzyme solutions, respectively.

얻을 수 있었다. 사용한 0.02 M phosphate buffer의 pH가 원형질체의 생성에 어떤 영향을 미치는 지를 조사하였다. Fig. 5에서 보는 것과 같이 pH 6.2, 7.0, 7.6에서 각각 $1.19, 1.40, 1.25 \times 10^6$ 개/mL의 원형질체가 생성되었는데, 실험한 각각의 pH 조건에 따라서 원형질체 생성량에는 차이가 없었다.

C. acutatum JC24 원형질체의 재생

탄저병균의 원형질체를 재생 PDB배지에 접종하고 재생되는 모습을 관찰하였다(Fig. 6). 접종 6시간 후부터 대부분의 원형질체에서 발아관이 생성되는 것을 관찰할 수 있었으며, 12시간 후에는 생성된 발아관이 정상적인 균사로 분화하는 것을 알 수 있었다. 배양 24시간 후에는 정상적인 균사체로 발달한 것을 볼 수 있었다. PDA 재생배지에서 삼투압 안정

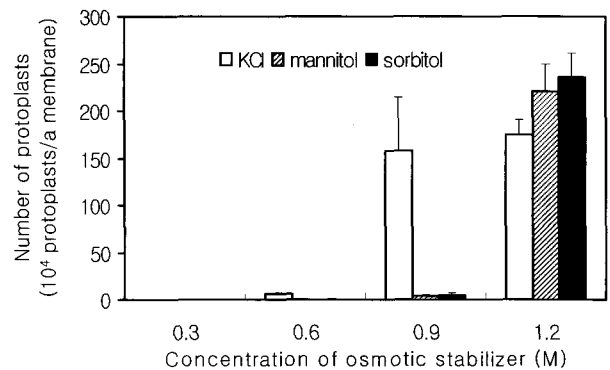


Fig. 4. Effect of osmotic stabilizers and their concentrations on the protoplast formation of *Colletotrichum acutatum* JC24. Osmotic stabilizers were tested to assess the activity stabilizing protoplasts released from mycelia. Each osmotic stabilizers were adjusted to indicated concentrations.

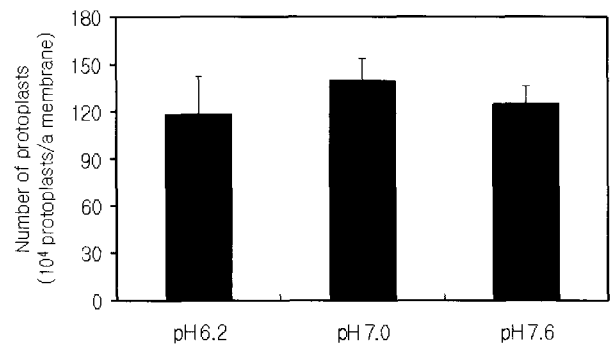


Fig. 5. Effect of pH of a phosphate buffer on the protoplast formation of *Colletotrichum acutatum* JC24. Cellophane membranes, on which *C. acutatum* JC24 was incubated at 25°C for 20 hrs under the dark condition, were soaked into 2% lysing enzyme solution prepared with 0.02 M phosphate buffer including 1.2 M of sorbitol. The pH of phosphate buffer was adjusted to 6.2, 7.0 and 7.6, respectively.

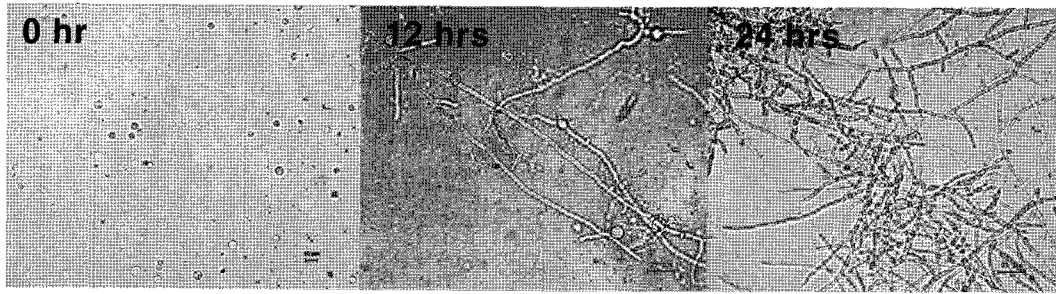


Fig. 6. Reversion of protoplasts from mycelia of *Colletotrichum acutatum* JC24. The morphology of reversion of protoplasts was observed in PDB, where hypotonic pressure was adjusted with 1.2 M of sorbitol, by lapse of time.

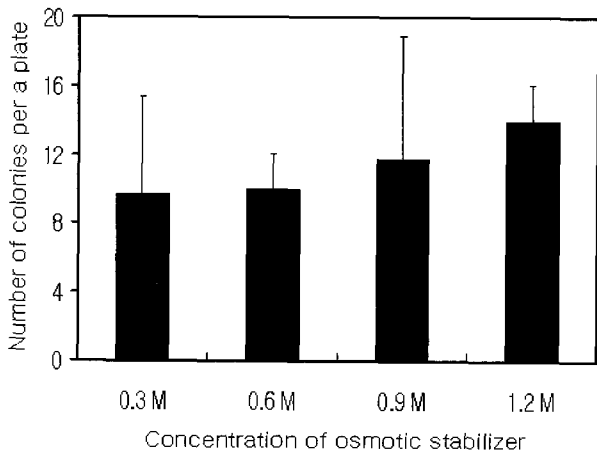


Fig. 7. Effect of the concentration of sorbitol, as a osmotic stabilizer, on the protoplast reversion of *Colletotrichum acutatum* JC24. To investigate whether protoplasts could grow to regular mycelia, protoplasts were flooded on PDA amended with sorbitol at each indicated concentration and incubated at 25°C. After incubation for 5 days, the number of colonies were counted.

제로 사용한 sorbitol이 원형질체의 재생률에 미치는 영향을 조사한 결과, Fig. 7과 같이 사용한 농도가 1.2 M의 경우에 재생률은 2.8%로 사용한 모든 농도 중에서 가장 높은 재생률

을 보였다. 그러나 실험에 사용한 모든 농도 간에 통계적인 유의성은 인정되지 않았다.

C. acutatum JC24 원형질체의 재생에 미치는 살균제의 영향

원형질체의 재생에 미치는 살균제의 영향은 Table 1에서 보는 것과 같이 살균제의 종류와 처리 농도에 따라서 다양하게 나타났다. 보호용 살균제인 propineb는 50 µg mL⁻¹ 처리구에서 군사생장 억제 효과가 43.8%인데 비하여, 10 µg mL⁻¹ 처리구에서의 원형질체 재생은 100% 억제되었다. Tebuconazole의 경우에는 0.5 µg mL⁻¹의 처리구에서 원형질체의 재생은 100% 억제되었지만, 군사생장은 85.1%가 억제되었다. 하지만 0.1 µg mL⁻¹ 처리구에서 원형질체 재생 억제효과는 0.9%로 거의 억제하지 못하는 수준이었지만, 군사생장은 75.7%나 억제하고 있었다. Fig. 8에서 보는 것과 같이 0.1 µg mL⁻¹의 tebuconazole 처리구에서의 재생 억제율이 0.9%밖에 되지 않지만, 형성된 균총의 크기는 무처리구와 비교하여 현저하게 저해되어있는 것을 알 수 있었다.

Tebuconazole, carbendazim의 농도가 각각 0.1, 10 µg mL⁻¹

Table 1. Inhibitory effect of several fungicides on protoplast reversion and mycelial growth of *Colletotrichum acutatum* JC24

Fungicides	Concentration (µg mL ⁻¹)	Inhibition ratio (%)	
		Protoplast reversion	Mycelial growth
Propineb	10	100	43.8
	5	3.8	21.6
Tebuconazole	0.5	100	85.1
	0.1	0.9	75.7
Carbendazim	100	41.5	78.0
	10	54.7	67.9
Carbendazim	100	0	71.5
+ Dethofencarb	10	0	66.1

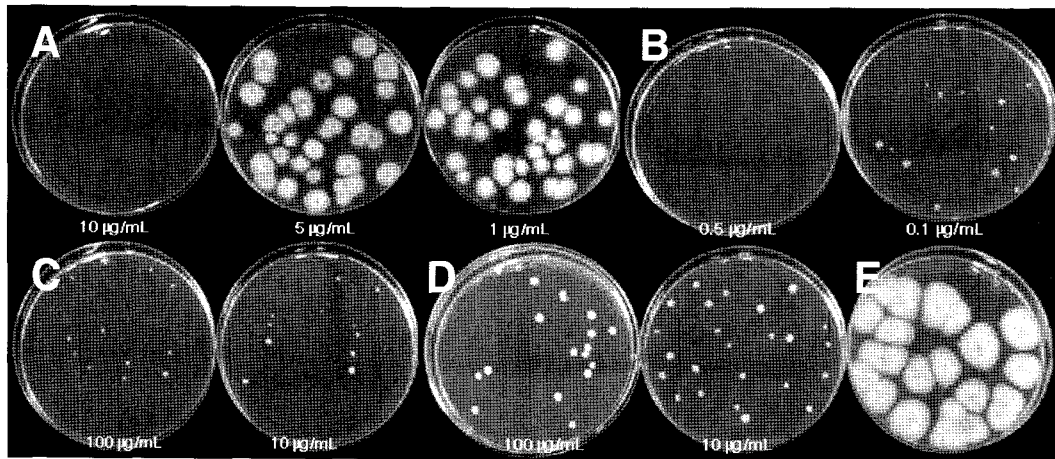


Fig. 8. The morphology of colonies of *Colletotrichum acutatum* JC24 on PDA. Protoplasts were flooded on PDA amended with sorbitol at each indicated concentration and incubated at 25°C. Hypotonic stress in PDA was adjusted with 1.2 M of sorbitol. The photograph of colonies was taken 5 days after inoculation.

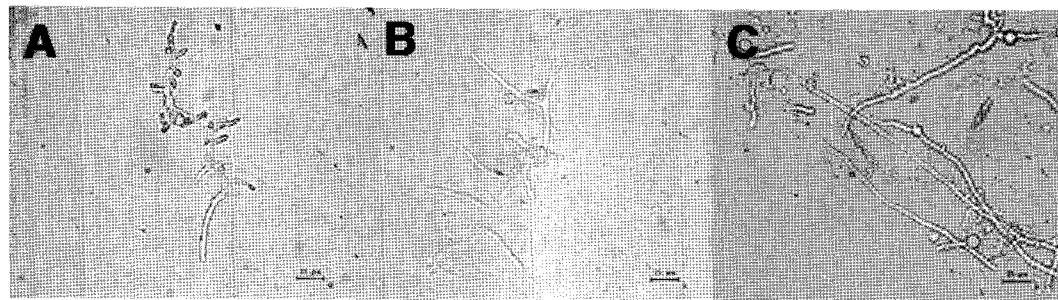


Fig. 9. Effect of fungicides on the protoplast reversion. A; 0.1 µg mL⁻¹ of tebuconazole, B; 10 µg mL⁻¹ of carbendazim, C; Untreated control.

이 되도록 첨가한 PDB에 원형질체를 접종하고, 재생되는 모습을 관찰하였다. Fig. 9에서 보는 것과 같이 접종하고 12 시간 후에 조사하면, 무처리구에 접종한 원형질체는 정상적인 균사체로 분화되어 있는데 비해서 **tebuconazole** 처리구에서는 2차 분지하는 균사의 절간 거리가 짧아져 있으며, 분지한 균사의 길이 역시 무처리구에 비하여 신장이 크게 억제되어 있는 것을 볼 수 있었다. **Carbendazim** 처리구에서는 원형질체가 균사체로 분화하는 과정에서 2차 분지되는 균사의 분지 각도가 90°에 가깝게 증가해 있는 것을 볼 수 있으며, 재생된 균사의 선단이 만곡되어 있는 것을 알 수 있었다. **Propineb**를 처리한 PDB에서 탄저병균의 원형질체는 재생되는 균사체에서 형태적 변화는 관찰하지 못하였다.

미토콘드리아의 호흡을 저해하는 것으로 알려져 있는 **trifloxystrobin**은 탄저병균의 원형질체 재생률에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 10). 그러나 Fig. 11과 같이 **trifloxystrobin** 처리구에서 나타난 균총을 무처리구의 균총과 비교하면, 균총의 직경이 작아져 있는 것을 알 수 있었다. Fig. 10에서 **trifloxystrobin**뿐만 아니라 **kresoxim-methyl**

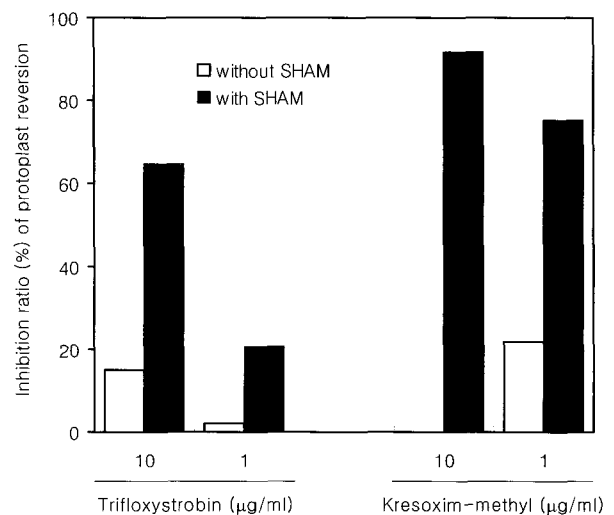


Fig. 10. Effect of salicylhydroxamic acid on the inhibitory activity of strobilurins, trifloxystrobin and kresoxim-methyl, against protoplast reversion.

역시 탄저병균 원형질체의 재생률에는 전혀 영향을 미치지 않고 있었지만, SHAM을 재생배지에 살균제와 동시에 처리

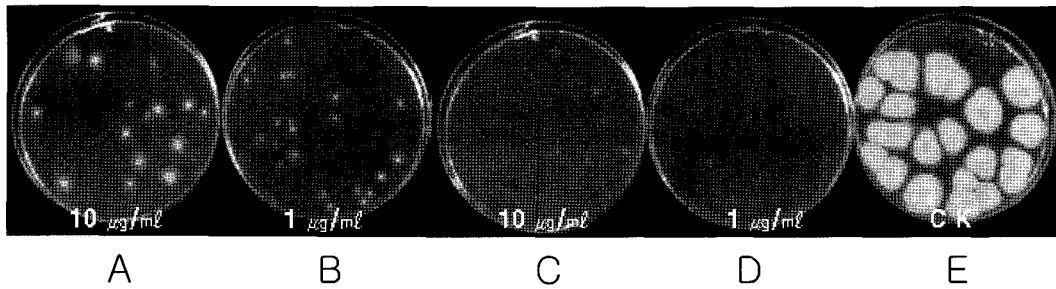


Fig. 11. The morphology of colonies, to which protoplasts from *Colletotrichum acutatum* JC24 were reverted, on PDA amended with 1.2 M of sorbitol. A and B; Kresoxim-methyl was included at 10 and 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. C and D; Additionally 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of salicylhydroxamic acid was amended into PDA with 10 and 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of kresoxim-methyl, respectively. E; Untreated control.

하였을 경우에는 trifloxystrobin과 kresoxim-methyl 모두 10과 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 의 처리구에서 15.1과 2.1%, 0과 21.9%이었던 재생 억제율이 SHAM을 처리한 처리구에서는 64.7과 20.7%와 91.8과 71.3%로 증가하였다.

고 찰

고추 탄저병균으로부터 원형질체를 얻기 위하여 25°C에서 20시간 배양한 탄저병균의 균사체를 사용하였을 때 가장 많은 양의 원형질체를 수확할 수 있었다. 삼투압안정제로는 1.2 M sorbitol을 사용하였고, 세포벽분해효소는 2%의 lysing enzyme를 사용하였다. pH는 0.02 M phosphate buffer를 사용하여 7.0으로 조절하여 실험을 수행하였다. 원형질체의 재생을 위해서는 PDA 배지에 삼투압안정제로 첨가한 sorbitol의 농도를 1.2 M로 조절하였을 때, 2 - 10%의 재생률을 보였다. 이상의 방법으로 살균제의 효과를 실험하는데 충분한 양의 원형질체를 얻을 수 있었으며, 재생률에 대한 효과를 검정함으로써 살균제가 가지는 다양한 특성을 조사할 수 있었다.

탄저병균은 액체 배지 상에서 배양할 경우, 균사체가 길게 신장하지 못하고 균사체 덩어리를 만들기 때문에 액체배양하여 양호한 균사체를 수확하기에는 문제가 있었다. 따라서 미생물로부터 원형질체를 획득하는 과정에서 세포벽분해효소, 삼투압 안정제, 미생물의 종류, 배양 조건, 온도와 pH 등은 원형질체의 생성과 재생에 영향을 미친다(Davis, 1985). Kreger와 Kopecka(1975)는 *Saccharomyces cerevisiae*에 상품화된 달팽이 효소를 처리하면 3-6시간 사이에 가장 많은 원형질체가 생성된다고 하였고, *Geotrichum candidum*을 이용한 Sagara(1969)는 7-10시간 처리하였을 때 수확량이 가장 많았다고 보고하였다. 하지만 탄저병균에서는 Sigma사가 판매하는 lysing enzyme를 2%의 용액으로 만들어 사용하였을 때, 2-3시간의 처리에서 충분한 원형질체가 생성되었으며,

더 오랜 기간 처리할 경우에는 초기에 생성되었던 원형질체가 파괴되었다. 원형질체를 수확할 때 사용하는 삼투압안정제와 그 사용농도는 원형질체의 생성량에는 큰 영향을 준다(Davis, 1985). *Aspergillus flavus*와 *Penicillium chrysogenum* 등과 같은 사상균의 삼투압 안정제로는 일반적으로 무기염이 효과가 우수하며, *Saccharomyces*와 같은 효모의 경우는 다당류가 좋은 효과를 나타낸다고 보고되어있다(Moore와 Peberdy, 1976; Peberdy 등, 1976; Stephen과 Nasim, 1981). *C. acutatum* 역시 0.9 M의 농도로 KCl과 mannitol 또는 sorbitol을 비교하여 보면 KCl의 경우가 원형질체를 더 많이 수확할 수 있지만, 1.2 M의 농도에서는 sorbitol을 사용하였을 때, 무기염인 KCl보다 많은 원형질체를 수확할 수 있었다. 특히 *C. acutatum*은 삼투압안정제의 농도가 높은 처리구에서 수확량이 많은 특이함을 보여주었다. *P. chrysogenum*은 pH 4와 8 사이에서 원형질체가 생성되었으며, 적정 pH는 5.5로 보고되었다(Peberdy 등, 1976). 본 실험에서는 pH를 6.2부터 7.6까지의 범위에서 실험을 하였는데, 생성량에는 유의성이 없었다.

원형질체를 이용한 살균제의 재생 억제 효과와, 한천희석법으로 균사 성장 억제 효과를 비교하여 보면 살균제의 효과에 차이가 있었다. 보호용 살균제인 propineb의 경우 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 의 처리구에서 균사성장 억제효과는 43.8%이었지만, 원형질체의 재생은 100% 억제되었다. 김 등(2003)은 micrititer plate를 사용하여 propineb가 *C. acutatum* JC24의 포자 발아에 미치는 효과를 조사하였는데, 동일한 보호용 살균제인 mancozeb와 chlorothalonil과는 다르게 효과가 매우 미미하였다. 원형질체의 재생은 두 단계로 구분할 수 있다. 원형질체에 세포벽이 다시 재생되는 단계와, 세포벽이 재생된 원형질체가 정상적인 균사체로 회복되는 단계로 구분할 수 있다. 따라서 세포벽이 없는 상태의 원형질체에 propineb를 처리하였을 때는 포자나 균사에 propineb를 처리하였을 때와 다르게, 병원균 내부로 살균제의 흡수가 용이하였기 때문에, 포자 발아와 균사

생장에 대한 억제효과보다 원형질체의 재생 억제 효과가 크게 나타났던 것으로 생각한다. Tebuconazole은 병원균의 ergosterol 생합성을 저해하는 살균제로 알려져 있다(Ziogas 등, 1991). Tebuconazole을 원형질체에 0.5와 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 을 처리하였을 때, 재생 억제효과는 100과 0.9%이었으나, 동일한 농도에서 균사생장에 대한 억제효과는 85.1와 75.7%로 나타났다. Ergosterol 생합성 저해 살균제는 식물병원진균의 sterol 대사 과정을 억제하여 균사의 성장을 억제할 뿐만 아니라 높은 농도에서는 세포막의 투과성에도 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다(Sancholle 등, 1983; Dahmen 등, 1988). 본 실험의 결과를 보면 tebuconazole의 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 처리에서는 원형질체가 크기는 작지만 균총을 형성하고 있었는데, 이는 세포막의 투과성에는 직접적으로 영향을 미치지 못하고 균사의 성장만을 억제하였기 때문이라고 생각한다. 하지만 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 을 처리한 경우에는 *C. acutatum* JC24의 세포막이 갖는 투과성에 영향을 줌으로써 재생이 불가능 했던 것으로 생각한다. β -Tubulin의 중합을 억제하는 것으로 알려진 carbendazim의 경우(Davise, 1986), 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 의 처리구에서 균사생장 억제율보다 재생억제율이 떨어지는 경향이 보였지만 통계적인 유의성은 인정할 수 없었다. 하지만 carbendazim과 diethofencarb의 혼합제가 원형질체의 재생을 전혀 억제하지 못하는 이유는 다른 보충 실험들을 통해서 찾아보아야 할 것으로 판단한다. 이상의 결과를 보면 세포벽이 없는 원형질체에 살균제를 처리할 경우는, 균체 내부로 살균제가 흡수되는 양과 경향이 세포벽을 가지는 포자나 균사와는 매우 다를 것으로 예측되고, 그에 따라서 균사 생장 억제와 원형질체의 재생 억제 효과가 다르게 나타나는 것이 아닌가 생각한다.

Strobilurin계 살균제는 식물 병원균의 미토콘드리아 호흡과정의 전자전달을 저해하는 것으로 알려져 있는데, 일부 사상균이 갖는 대체호흡 때문에 실내 검정을 통하여 strobilurin계 살균제의 효과를 조사하기가 어렵기 때문에, 대체호흡을 저해하는 salicylhydroxamic acid(SHAM)을 동시에 처리함으로써 실내 검정에서 strobilurin계 살균제의 효과를 상승시킬 수 있다(Olaya 등, 1999; Wood와 Hollomon, 2003). *Venturia inaequalis*에서 SHAM을 처리함으로써 kresoxim-methyl의 효과가 상승한다는 보고가 있다(Olaya 등, 1999). 그러나 *C. acutatum*의 경우는 포자나 균사에 strobilurin계 살균제를 처리할 때에 SHAM을 동시에 처리하여도 상승효과가 크지 않기 때문에 실내 검정에서 살균제의 효과를 조사하거나 살균제 발현을 검정하기가 어려운 실정이다. 그러나 Fig. 11에서 보는 것과 같이 원형질체에 strobilurin계인 trifloxystrobin과 kresoxim-methyl을 단독으로 처리했을 때 매우 낮았던 재생

억제율이, SHAM을 동시에 처리함으로써 상승하는 것을 볼 수 있었다. 특히 kresoxim-methyl의 경우에는 10과 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 에서 0과 21.9%의 억제율이 91.8과 75.3%로 상승하였다. 지금까지 실내에서 고추 탄저병균인 *C. acutatum*에 대한 strobilurin계 살균제의 효과 검정이 어려워서 살균제 저항성 발현에 대한 모니터링을 수행할 수가 없었다. 그러나 본 실험의 결과처럼 탄저병균의 원형질체에 strobilurin계 살균제와 SHAM을 동시에 처리한다면 실내실험에서도 strobilurin계 살균제의 효과 검정이 가능할 것이며, 또한 식물 병원균의 살균제 저항성 발현에 대한 모니터링할 수 있을 것으로 생각한다.

이상과 같이 고추 탄저병균인 *C. acutatum*에 세포벽 분해효소를 처리함으로써 원형질체를 쉽게 얻을 수 있었는데, 수확한 원형질체는 살균제의 특성을 조사하는데 충분히 이용할 수 있을 것으로 판단한다. 특히 SHAM이라는 대체호흡을 억제하는 저해제와 동시에 처리함으로써 trifloxystrobin과 kresoxim-methyl과 같은 strobilurin계 살균제의 실내검정이 가능해져서 저항성 발현에 대한 모니터링을 수행할 수 있을 것으로 생각한다. 또한 *C. acutatum*에서 얻은 원형질체를 이용함으로써 REMI 방법을 통한 다양한 인공 돌연변이균의 확보가 가능해져서, 고추 탄저병균의 유전자 기능을 연구하는데 도움이 될 수 있을 것으로 생각한다.

감사의 글

이 논문은 농촌진흥청의 바이오그린연구사업의 연구비에 의해서 수행된 것으로 연구비의 지원에 감사드립니다.

>> 참 / 고 / 문 / 헌

- Bachmann, B. J. and D. M. Bener (1981) Protoplasts from *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 78:550-556.
- Dahmen, H., H. C. Hoch and T. Staub (1988) Differential effects of sterol inhibitors on growth, cell membrane permeability, and ultrastructure of two target fungi. Phytopathology 78:1033-1042.
- Davise, L. C. (1986) Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. Ann. Rev. Phytopathol. 24:43-65.
- Davis, B. (1985) Factors influencing protoplast isolation. p 45-71. ed. by J. F. Peberdy and L. Ferenczy in Fungal protoplasts; Application in biochemistry and genetics. pp. 354.
- Harris, G. M. (1982) Protoplasts from *Gibberella fujikuroi*. Phytopathology 72:1403-1407.
- He, Z., M. S. Price, G. R. Brian, D. R. Georgianna and G. A.

- Payne (2007) Improved protocols for functional analysis in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. BMC Microbiology 7:104-115.
- Kim, C. H. and K. S. Park (1988) A predictive model of disease progression of red-pepper anthracnose. Kor. J. Plant Pathol. 4:325-331.
- Kim, J. T., S. Park, W. Choi, Y. Lee and H. T. Kim (2008) Characterization of *Colletotrichum* isolates causing anthracnose of pepper in Korea. Plant Pathol. J. 24:17-23.
- Kreger, D. R. and M. Kopecka (1975) On the nature and formation of the fibrillar nets produced by protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* in liquid media: An electro-microscopic, X-ray diffraction and chemical study. J. Gen. Microbiol. 92:207-220.
- Moore, P. M. and J. F. Peberdy (1976) Release and regeneration of protoplast of the conidia of *Aspergillus flavus*. Trans. Br. Mycol. Soc. 66:421-425.
- Ogawa, K., N. Yoshida, W. Gesnara, C. A. Omumasaba and C. Chamuswam (2000) Hybridization and breeding of the benomyl resistant mutant, *Trichoderma harzianum* antagonized to phytopathogenic fungi by protoplast fusion. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64:833-836.
- Olaya, G., D. Zheng and W. Koller (1999) Differential responses of germinating *Venturia inaequalis* conidia to kresoxim-methyl. Pesticide Sci. 54:230-236.
- Park, K. S. and C. H. Kim (1992) Identification, distribution and etiological characteristics of anthracnose fungi of red pepper in Korea. Kor. J. Plant Pathol. 8:61-69.
- Peberdy, J. F., C. E. Buckley, D. C. Daltry and P. M. Moore (1976) Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 67:23-26.
- Sagara, Y. (1969) Studies on protoplasts of *Geotrichum candidum*: Mechanism of formation of protoplasts and their physical and morphological properties. Tokushima J. Exp. Med. 16:57-69.
- Sancholle, M., J. D. Weete and C. Montant (1983) Effects of triazoles on fungi: I. Growth and cellular permeability. Pesticide Biochem. Physiol. 21:31-44.
- Shin, H. J., Z. J. Chen, J. M. Hwang and S. G. Lee (1999) Comparison of pepper anthracnose pathogen from Korea and China. Plant Pathol. J. 15:323-329.
- Stephen, E. R. and A. Nasim (1981) Production of protoplasts indifferent yeasts by mutanase. Can. J. Microbiol. 27:550-553.
- Talhinhas, P., S. Muthumeenakshi, J. Neves-Martins, H. Oliveira and S. Sreenivasaprasad (2008) Agrobacterium-mediated transformation and insertional mutagenesis in *Colletotrichum acutatum* for investigating varied pathogenicity lifestyles. Mol. Biotechnol. (in press).
- Teraoka, T., Y. Shimura, D. Hosokawa and M. Watanabe (1992) Giant protoplast of *Pyricularia oryzae* Cava. Ann. Phytopath. Soc. Japan 58:726-733.
- Wood, P. M. and D. W. Hollomon (2003) A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. Pest Manag. Sci. 59:499-511.
- Ziogas, B. N., G. Oesterheld, P. Masner, C. C. Steel and R. Furter (1991) Fenpropomorph: A three site inhibitor of ergosterol biosynthesis in *Nectria haematococca* var. *cucurbitae*. Pesticide Biochem. Physiol. 39:74-83.
- 김재정, 김준태, 박성우, 박은숙, 김흥태 (2003) 고추 탄저병균의 포자 발아와 부착, 균사 생장에 미치는 화합물의 활성 검정법 확립 및 살균제의 효과. 농약과학회지 7:159-168.

고추 탄저병균(*Colletotrichum acutatum*)의 원형질체 형성과 원형질체를 이용한 살균제 효과 검정

김명기 · 김흥태*

충북대학교 농업생명환경대학 응용생명환경학부 식물의학전공

요 약 고추 탄저병균인 *Colletotrichum acutatum* JC24는 PDA 배지에 치상한 cellophane막에 포자 접종하여 25°C의 암상태에서 20시간 배양한 균사체를 2%의 lysing enzyme에 2-3시간 처리하여 2-3 × 10⁶ 개/mL의 원형질체를 수확할 수 있었다. 이때에는 0.02 M phosphate buffer(pH 7.0)와, 삼투압 안정제로는 1.2 M sorbitol용액을 사용하였을 때가 원형질체의 생성량이 가장 높았다. *C. acutatum* JC24의 균사체에서 얻은 원형질체에 propineb를 10 µg mL⁻¹를 처리하였을 경우에, 균사생장 억제효과는 미미하였지만 원형질체의 재생은 100% 억제하였다. Tebuconazole의 재생 억제효과는 균사생장 억제 효과와는 큰 차이를 보였는데, 0.5 µg mL⁻¹ 처리구에서는 원형질체의 재생이 100% 억제되었고, 0.1 µg mL⁻¹ 처리구에서는 0.9%밖에 억제하지 못하였다. 하지만 동일한 농도에서 균사생장에 대한 억제효과는 85.1과 75.7%로 억제의 경향이 매우 달랐다. Carbendazim의 경우에는 원형질체 재생과 균사생장에 미치는 효과가 비슷하였다. Trifloxystrobin과 kresoxim-methyl을 SHAm과 동시에 처리하였을 원형질체의 재생에 대한 억제 효과가 크게 상승하였다.

색인어 *Colletotrichum acutatum*, 원형질체, 살균제 효과 검정, strobilurin계, salicylhydroxamic acid