

무 시들음병균이 생산하는 Phytotoxin의 병원성 및 저항성에서 역할

심선아^{1,2} · 김진철¹ · 장경수¹ · 최용호¹ · 김홍태² · 최경자^{1*}

¹한국화학연구원 바이오화학연구센터, ²충북대학교 식물의학과

Role of a Phytotoxin Produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* on Pathogenesis of and Resistance to the Fungus

Sun-Ah Shim^{1,2}, Jin-Cheol Kim¹, Kyoung Soo Jang¹, Yong Ho Choi¹, Heung Tae Kim², and Gyung Ja Choi^{1*}

¹Research Center for Biobased Chemistry, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-600, Korea

²Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract. In the course of a developing screening method for resistant radish to *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*, we found that the fungus produces phytotoxic compound against *Raphanus sativus*. The culture filtrate of *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 represented the strongest phytotoxicity when the fungus was incubated in the malt extract broth with 150 rpm at 25°C for 14 days. Under bioassay-guided purification, we isolated a substance from liquid culture of *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1, with phytotoxic effect against *R. sativus*. The compound was identified as fusaric acid by mass and nuclear magnetic resonance spectral analyses. Phytotoxicity of the compound against cruciferous vegetable crops, including radish, cabbage, and broccoli, was investigated. Fusaric acid represented phytotoxicity on radish seedlings by concentration dependant manner. And the phytotoxin demonstrated strong phytotoxicity on the resistant cultivars as well as susceptible cultivars of radish to *F. oxysporum* f. sp. *raphani*. In addition, fusaric acid isolated from the fungus also showed a potent phytotoxic efficacy against non-host Brassicaceae crops of the fungus such as cabbage and broccoli. The results demonstrate that fusaric acid produced by *F. oxysporum* f. sp. *raphani* is non-host-specific toxin and for screening of resistant radish to the fungal pathogen, spore suspension of the fungus without the phytotoxin has to be used.

Additional key words: breeding, fusaric acid, non-host-specific toxin, wilt disease

서 언

Fusarium 속 균은 전 세계적으로 많은 종의 식물에 심각한 병을 일으키는 병원균으로, 병을 일으키는 기주에 따라 120개 이상의 f. sp.로 구성되어 있다(Agrios, 2005). 무 시들음병은 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*에 의해 발생하는 토양 전염병으로 토양 내에서 후벽포자를 형성하여 기주식물 없이도 수년간 휴면상태로 존재하는 것이 가능하다(Van Peer et al., 1988). 이 병에 감염되면 식물의 하위 잎이 황갈색으로 되며 식물체가 시들고, 뿌리의 도관부는 흑갈색으로 변하여 심하면 식물이 고사한다(Kendric and Snyder, 1936;

Peterson and Pound, 1960). 무 시들음병은 1934년 미국 캘리포니아 San Benito에 있는 White Chinese Winter Radish 채종포에서 처음 보고되었으며 1946년 위스콘신 Waukesha의 무 포장에서 시들음병의 발생이 보고된 후 현재는 미국 각지에서 발생하고 있다(Pound, 1959; Pound and Fowler, 1953). 우리나라에서는 1981년 청원군 미농 재배단지에서 처음 발견되었으며, 계속된 연작으로 인하여 시들음병 발생이 점차 증가하고 있다(Moon et al., 2001; Nam, 1994). 무 시들음병의 방제를 위한 방법은 윤작, 토양 훈증, 종자 소독, 질소 비료 과용 금지 등이 있으나, 가장 효과적이고 환경 친화적인 방제 방법은 저항성 품종의 재배이다. 현재 무 시들

*Corresponding author: kjchoi@kriict.re.kr

※ Received 9 April 2013; Revised 7 May 2013; Accepted 7 June 2013. 본 연구는 농림축산식품부 생명산업기술개발사업의 채소병리검정지원사업단(과제번호: 609002-5호)의 지원에 의해 이루어진 것이다.

© 2013 Korean Society for Horticultural Science

음병에 대한 저항성 품종은 여러 회사에서 판매 중에 있다. 하지만 저항성 유전자의 규명 및 저항성 품종 육성을 위한 분자마커 등은 거의 보고된 바 없다(Baik et al., 2011).

Fusarium 속에 속하는 많은 종의 곰팡이들은 각종 식물 및 동물에 활성을 보이는 다양한 2차 대사산물을 생산한다. 이차 대사산물에는 *Fusarium* 속 균으로 오염된 곡류의 섭취시 인체에 중독증을 일으키는 mycotoxin, 식물에 독성을 나타내는 phytotoxin 및 미생물에 대하여 항균 활성을 보이는 항생물질 등이 있으며, 활성을 나타내는 2차 대사산물뿐만 아니라 다양한 색소도 생성한다(Vesonder and Golinski, 1989). *Fusarium* 속이 생산하는 phytotoxin에는 fusaric acid, fumonisins, beauvericin, enniatin, moniliformin 및 trichothecenes 등이 있다(Abbas et al., 1991; Amalfitano et al., 2002; Bacon et al., 1996; Capasso et al., 1996; Idris et al., 2003; Zonno et al., 1996). 이러한 독소들은 괴사, 백화 현상, 생장 억제, 시들음, 종자발아 억제 등을 일으키는 것으로 알려져 있다(Desjardins and Hohn, 1997; Van Asch et al., 1992; Wakulinski, 1989). Fusaric acid는 다양한 *Fusarium* 속이 생산하는 독소로 알려져 있으며, trichothecenes에 속하는 독소인 T-2, HT-2는 *Fusarium* 속뿐만 아니라 *Trichoderma* 속이나 *Myrothecium* 속 등의 곰팡이에 의해서도 생성된다. 특히 T-2 독소는 *Fusarium* 속 곰팡이 독소 중에서 가장 활성이 강한 것으로 알려져 있다(Gaumann, 1957; Kern, 1972; Lee et al., 2012; Placinta et al., 1999; Song et al., 2006). Enniatin과 fumonisin은 유용한 제초제로 평가되고 있으며, 9,10-dehydrofusaric acid는 기생식물인 *Striga hermonation*의 종자 발아를 억제한다(Abbas et al., 1991; Hershenhorn et al., 1992; Zonno et al., 1996).

본 연구에서는 무 시들음병(*Fusarium wilt*)에 대한 저항성을 검정하는 체계를 확립하던 중 병원균인 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*가 phytotoxin을 생산한다는 것을 확인하고, 이 물질을 분리하고 동정하였다. 그리고 이 병원균의 병원성 및 이 곰팡이에 대한 무의 저항성에서 이 독소의 역할을 규명하기 위하여, 무 시들음병에 대한 저항성 정도가 서로 다른 무 품종들과 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*의 비기주 배추과 작물인 양배추와 브로콜리에 대한 독소의 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

독소 생산을 위한 무 시들음병원균 배양

무 시들음병원균의 phytotoxin 생산을 위하여 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 균주를 potato dextrose agar(PDA; Becton,

Dickinson and Co.) 배지에 접종하고 14일 동안 배양한 후에 균총으로부터 균사 조각을 떼어 malt extract broth(MEB; Becton, Dickinson and Co.)에 접종하고 이를 25°C에서 14일 동안 150rpm으로 진탕배양하였다. 병원균의 배양액은 4 겹의 거즈로 걸러 균사를 제거하고, 원심분리(9,500g, 10min, 4°C)한 후에 상정액을 취하여 실험에 사용하였다.

Phytotoxin 생산을 위한 최적의 배지를 선발하기 위하여 nutrient broth(NB; Becton, Dickinson and Co.), Czapek-dox broth(CDB; Becton, Dickinson and Co.), tryptic soy broth(TSB; Becton, Dickinson and Co.), potato dextrose broth(PDB; Becton, Dickinson and Co.) 및 MEB 등 5종의 액체 배지에 KR1 균주의 균사 조각을 접종하고 앞에서와 같은 방법으로 배양하고 배양여액을 취하여 실험에 사용하였다.

또한, 접종 후 배양 기간에 따른 독소 생산성을 비교하기 위하여 MEB 배지에 KR1 균주의 균사 조각을 접종하고 25°C에서 각각 5, 8, 11, 14, 17일 동안 배양한 후에 위와 같은 방법으로 배양여액을 수확하였다. 그리고 이들은 phytotoxicity test까지 -20°C 냉동고에 저장하였다.

Phytotoxin의 분리

F. oxysporum f. sp. *raphani*가 생산하는 phytotoxin은 다음과 같은 방법으로 분리하였다. 총 6L의 MEB 배지에 KR1 균주를 배양한 후에 얻은 배양여액을 ethyl acetate와 *n*-butanol 순서로 각각 2회 추출하고 감압농축하여 ethyl acetate, *n*-butanol 및 수용액층으로 분획하였다. 생물 검정(phytotoxicity test)을 통하여 *n*-butanol 층(400mg)이 무 유묘에 독성을 나타내는 것을 확인하였고, *n*-butanol 층으로부터 활성 물질을 분리하기 위하여 100% methanol을 전개 용매로 Sephadex-LH20 column chromatography(25-200 μ m, 2cm i.d. \times 40cm, Sigma-Aldrich)를 하여 얻은 3개의 분획물 중 F2(150mg)가 활성을 나타냈다. F2 층을 silica gel TLC plate(20 \times 20 \times 0.5cm, Merck)에 로딩하고 chloroform:methanol:water = 30:9:1(v/v/v) 용매로 preparative TLC를 실시하여 5개의 분획물을 얻었다. 이들 중 F2-3(45.7mg)이 활성을 나타내어 이를 앞에서와 동일한 방법으로 Sephadex-LH20 column chromatography를 다시 실시하여 4개의 분획물을 얻었다. 이들 중 F2-3-2(26.3mg)이 활성을 나타내어 이를 Sep-Pak C₁₈ cartridge(Waters)에 시료를 주입하고 100% H₂O부터 100% MeOH까지 순차적으로 물질들을 용출하여 순수한 활성 물질인 SP 화합물(11.8mg)을 얻었다.

기기분석

분리한 SP 화합물의 구조를 동정하기 위하여 질량 분석

및 핵자기 공명 분석을 실시하였다. 질량 분석은 화학물질 이온화(chemical ionization, CI) 모드로 질량분석기(JEOL, JMS-DX303; JEOL Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 그리고 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼은 Bruker AMX-500 (500MHz) NMR spectrometer(Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Rheinstetten, Germany)로 측정하였으며, tetramethylsilane (TMS)을 internal standard로 이용하였다.

Phytotoxicity Test

F. oxysporum f. sp. *raphani*의 배양여액, 물질 분리의 중간과정에 있는 분획물들 그리고 순수물질 fusaric acid의 phytotoxicity test는 다음과 같은 방법으로 실험하였다. ‘장생무’(아시아종묘) 종자를 8×16 연결 포트(포트당 토양 15mL, 범농)에 원예용상토 5호(부농)를 넣고 포트당 1립씩 파종하여 온실에서 10-12일 재배한 무 유묘를 실험에 사용하였다. 온실에서 재배한 무의 뿌리를 물로 세척하여 흙을 제거한 후에 이를 vial(7mL)에 넣고 무의 뿌리가 침지되도록 배양여액, 분획물 용액 및 fusaric acid 용액을 5mL씩 넣고 수분 증발을 막기 위하여 병의 입구를 parafilm으로 감아 주었다. 이때 분획물 및 fusaric acid는 메탄올(MeOH)로 용해하였으며, MeOH의 최종농도가 1%가 되도록 1mM MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, Sigma) buffer와 1% sucrose(Sigma)의 혼합용액(MESS 용액)에 첨가하였다. 배양여액도 마찬가지로 MESS 용액으로 희석하였으며, 무처리구는 약제 없이 MESS 용액만을 처리하였다. 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

무 유묘가 처리 용액을 모두 흡수하였을 경우에는 뿌리가 마르지 않도록 vial에 MESS 용액을 추가로 넣어주었다. 처리한 무 유묘는 25°C 항온습실실에서 하루에 12시간씩 광을 처리하며 무 유묘에 시들음 증상이 나타날 때까지 약 2-5일 동안 재배한 후에 약해를 조사하였다. 약해 정도는 0 = 건전, 1 = 1-25%의 시들음, 2 = 26-50%의 시들음, 3 = 51-80%의 시들음, 4 = 81% 이상의 시들음 등의 5단계로 하였다.

배추과 작물에 대한 fusaric acid의 활성을 조사하기 위하여 시들음병에 대한 저항성 정도가 서로 다른 무 5개 품종 즉 저항성인 ‘명산무’, 중도저항성인 ‘청두무’와 ‘장생무’, 감수성인 ‘청수궁중무’와 ‘미농조생무’, 양배추 4개 품종 즉 저항성인 ‘YR호남’과 ‘그랜드마트’, 감수성인 ‘꼬꼬마’와 ‘레드마트’, 그리고 브로콜리 품종 3개(‘베리돔’, ‘그랜저’, ‘에이스돔’) 배추과 작물 총 12개 품종을 앞에서와 마찬가지로 방법으로 재배하고 분리한 SP 화합물의 활성을 조사하였다.

시들음병 저항성 검정

무, 양배추 및 브로콜리 등의 배추과 작물들의 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*와 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*에 대한 저항성 정도를 조사하기 위하여 fusaric acid의 phytotoxicity test와 동일한 12개의 품종을 8×16 연결 포트(포트당 토양 15mL, 범농)에 원예용상토 5호(부농)를 넣고 종자를 1립씩 파종하여 온실($25 \pm 5^\circ\text{C}$)에서 14일 동안 재배한 유묘를 실험에 사용하였다.

무는 기주이나 양배추는 비기주 식물인 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 균주와 양배추가 기주인 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* KR3 균주의 균사 조각을 각각 MEB 액체 배지에 접종하고 이를 25°C에서 7일 동안 150rpm으로 진탕 배양하였다. KR1과 KR3 균주의 배양액은 4겹의 거즈로 걸러 균사를 제거한 후에 원심분리(9,500g, 10min, 4°C)하여 포자를 수확하고, 광학현미경 하에서 hemocytometer를 이용하여 포자(소형분생포자)의 농도를 측정하였다. 포자 농도가 1.0×10^7 spores·mL⁻¹가 되도록 멸균수로 희석하여 접종원으로 사용하였다.

재배한 12개 품종의 뿌리를 물로 세척하여 흙을 제거한 후에 준비한 시들음병균 포자 현탁액에 30분 동안 침지하여 접종 한 후 5×8 연결 포트(포트당 토양 50mL, 범농)에 원예용상토 5호를 넣고 이식하였다. 접종 후 25°C 습실실에서 24시간 동안 배양한 후에 25°C 항온습실로 이동하여 하루에 12시간씩 광을 조사하면서 재배하였다. 약 3주 후에 유묘의 시들음병 발생을 조사하였으며 모든 실험은 10반복으로 2회 실시하였다. 발병 정도는 0 = 건전, 1 = 지하부는 갈변되나 지상부는 시들지 않고 병징이 없는 것, 2 = 지하부는 갈변되고 지상부는 시드는 것, 3 = 지하부는 갈변되고 지상부는 시들며 황화하는 것, 4 = 지하부는 갈변되고 지상부는 심하게 황변하여 시들고 낙엽된 것, 5 = 고사 등 6단계로 하였으며, 평균 발병도가 1.0 이하인 경우에는 저항성, 1.1-2.5는 중도저항성, 2.5 초과는 감수성으로 판정하였다.

결과 및 고찰

배지 종류에 따른 Phytotoxin 생산

F. oxysporum f. sp. *raphani*의 phytotoxin 생산을 위한 최적 배지를 선발하고자 KR1 균주를 NB, CDB, TSB, MEB, PDB 등 5종의 액체배지에서 배양하고 이들 배양여액의 무에 대한 독소 활성을 비교한 결과, 실험에 사용된 모든 배지의 배양여액은 독소 활성을 나타내었다(Fig. 1). 그러나 NB와 TSB 배지에서는 병원균을 배양하지 않은 배지를 처리하였을 때에도 무 유묘가 고사하였다. 따라서 KR1 균주의 NB

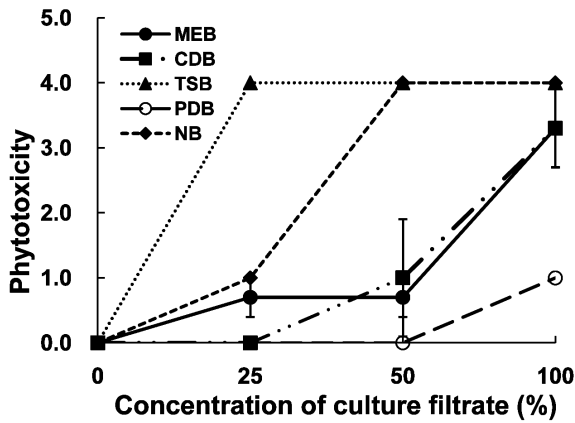


Fig. 1. Phytotoxin production of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* in five incubation media. Mycelial plugs of *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 were inoculated in incubation media and incubated in a shaking incubator at 25°C for 14 days. To remove spores and mycelia of the fungus, the fungal culture was filtered with four layers of cheese cloth and centrifuged. Ten-day-old seedlings of radish were treated with the cultural filtrate by dipping the roots of the plants. The applied plants were incubated in a growth chamber at 25°C. After 2 days, phytotoxicity of the culture filtrate on the seedlings was investigated as follows: 0, healthy; 1, wilt of 1-25%; 2, wilt of 26-50%; 3, wilt of 51-80%; 4, wilt of more than 81%. Each value represents the mean \pm standard deviation of three replicates. NB, nutrient broth; CDB, Czapek-dox broth; TSB, tryptic soy broth; MEB, malt extract broth; PDB, potato dextrose broth.

와 TSB 배양여액 처리구의 약해(phytotoxicity)는 KR1 균주가 생산한 독소의 활성인지 배지 성분에 의한 것인지 구분하기 어려우므로, 이들 배지는 독소의 생산에는 적합하지 않은 배지로 생각되었다. 한편 CDB와 MEB 배지의 배양여액은 원액 농도에서는 유사한 활성을 나타내었으나, 처리농도가 낮아질수록 MEB 배지가 더 높은 활성을 보였다. 그러므로 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 균주의 phytotoxin 생산을 위한 최적 배지로 MEB 배지를 선발하였다.

배양 기간에 따른 Phytotoxin 생산

F. oxysporum f. sp. *raphani*의 phytotoxin 생산을 위한 최적 배양 기간을 조사하기 위하여 KR1 균주를 각각 5, 8, 11, 14, 17일 동안 배양한 후에 수확한 배양여액(원액 농도)의 phytotoxicity test를 조사하였다. 그 결과, 접종 후 5일부터 11일까지 동안 배양한 것들은 무 유묘에 유사한 활성을 나타냈으며, 접종 후 14일 동안 배양한 배양여액은 가장 높은 독소 활성을 보였다. 그러나 17일 동안 배양한 후에는 활성이 약간 감소하였다(Fig. 2). 그러므로 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 균주는 14일 동안 배양하였을 때 독소 생산이 최대에 이른다고 생각되었다.

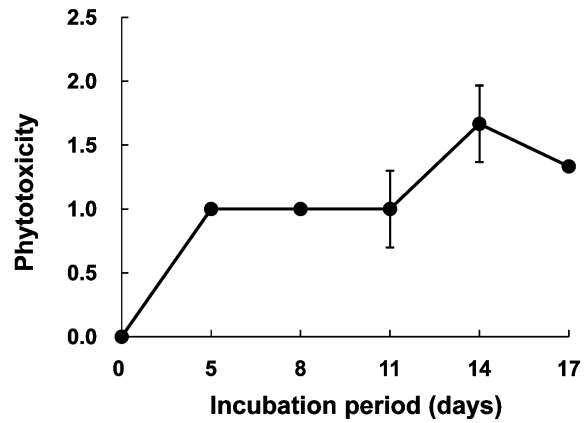


Fig. 2. Phytotoxin production of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* according to incubation period. Mycelial plugs of *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 were inoculated in malt extract broth and incubated in a shaking incubator at 25°C for 5, 8, 11, 14, and 17 days. For removing spores and mycelia of the fungus, the fungal culture was filtered with four layers of cheese cloth and centrifuged. Ten-day-old seedlings of radish were treated with the cultural filtrates by dipping the roots of the plants. The applied plants were incubated in a growth chamber at 25°C. After 2 days, phytotoxicity of the culture filtrate on the seedlings was investigated as follows: 0, healthy; 1, wilt of 1-25%; 2, wilt of 26-50%; 3, wilt of 51-80%; 4, wilt of more than 81%.

Table 1. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ data of SP compound produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* KR1.

Carbon assignment	Chemical shifts (ppm)	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	8.39	147.9
3	8.21	144.2
3	7.98	141.5
4	2.73	125.4
5	1.61	34.1
6	1.33	33.4
7	0.92	23.2
8		14.1

Phytotoxin의 동정

F. oxysporum f. sp. *raphani*의 배양액으로부터 분리한 sp 화합물의 구조를 동정하기 위하여 다양한 기기 분석을 실시하였다. SP 화합물의 분자량을 확인하기 위하여 CI-MS(양이온 mode)로 분석한 결과, $[\text{M} + \text{H}]^+$ 이온이 m/z 180에서 나타나 분자량은 179이라고 생각되었다. SP 화합물의 정확한 구조를 확인하기 위하여 $^{13}\text{C-NMR}$ 과 $^1\text{H-NMR}$ 분석을 실시하여 탄소와 수소의 위치를 결정하였으며 분자식은 $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$ 이었다(Table 1). SP 화합물의 NMR data는 Burmesiter et al.(1985)이 보고한 fusaric acid와 일치하여 SP 화합물은 fusaric acid임을 알 수 있었다(Fig. 3).

Fusaric acid는 Yabuta et al.(1937)에 의하여 처음 보고되

있으며, 토마토 시들음병을 일으키는 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*에서 분리한 대사산물 중 하나라고 하였다(Gaumann, 1957; Yabuta, 1937). 또한 Bacon et al.(1996)은 *F. moniliforme*, *F. crookwellense*, *F. subglutinans*, *F. sambucinum*, *F. napiforme*, *F. heterosporum*, *F. oxysporum*, *F. solani* 및 *F. proliferatum* 등 서로 다른 78개 *Fusarium* 속 균주의 fusaric acid 생산에 대하여 조사한 결과, fusaric acid는 다양한 *Fusarium* 속에서 광범위하게 생산되며 *Fusarium* 시들음병을 일으키는데 도움을 준다고 하였다. 일반적으로 fusaric acid는 옥수수, 수수 등의 곡물류에 병을 일으키는 *Fusarium* 속이 많이 생산한다고 알려져 있다. 한편, 수박, 토마토, 아마, 양배추 및 카네이션을 기주로 하는 *F. oxysporum* 균주가 생산하는 fusaric acid는 보고된 바 있으나(Davis, 1969; Luz et al., 1990; Marasas

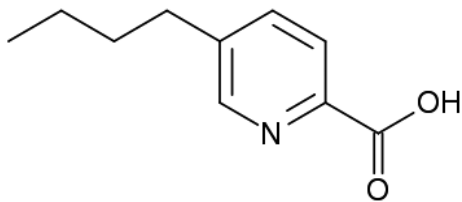


Fig. 3. Chemical structure of fusaric acid.

et al., 1984; Porter et al., 1990; Smith and Sousadias, 1993), 무를 기주로 하는 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*의 fusaric acid 생산은 처음으로 보고하는 바이다.

배추과 작물에 대한 Fusaric Acid의 활성

배추과 작물의 *Fusarium* 시들음병균들(*F. oxysporum* f. sp. *raphani*와 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*)에 대한 무 5개, 양배추 4개 및 브로콜리 3개 품종의 저항성을 조사한 결과, *F. oxysporum* f. sp. *raphani*에 대해 무 유묘는 품종에 따라 저항성 혹은 감수성을 보였으나, 양배추와 브로콜리는 품종에 관계없이 저항성을 나타내었다(Table 2). 반대로 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*에는 양배추는 품종에 따라 저항성 혹은 감수성을 보였으나 무에서는 품종에 관계없이 저항성을 나타냈다. 일반적으로 브로콜리의 *Fusarium* 시들음병의 병원균은 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*로 알려져 있으나, 실험한 브로콜리 3개 품종에서 1.4-2.3의 발병도를 보일 뿐이었다. 이들 결과로부터 배추과 작물의 *Fusarium* 시들음병균들 중 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*는 무가 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*는 양배추가 기주 식물이므로 품종에 따라 저항성 및 감수성을 보임을 알 수 있었다.

Table 2. Phytotoxic effect of fusaric acid and development of *Fusarium* wilt on fourteen commercial cultivars of cruciferous vegetable crops.

Crop	Cultivar	Phytotoxicity ^z	Disease index ^y			
			<i>f. sp. raphani</i>		<i>f. sp. conglutinans</i>	
Radish	Myongsan	3.7 ± 0.6	1.0 ± 1.1 ^x	R ^w	1.4 ± 1.1	MR
	Chungdu	3.7 ± 0.6	1.9 ± 0.9	MR	2.3 ± 1.6	MR
	Jangsaeng	3.3 ± 0.6	2.5 ± 1.6	MR	1.3 ± 0.8	MR
	Minongjosaeng	3.3 ± 0.6	3.4 ± 1.4	S	1.4 ± 0.7	MR
	Chungsukungjung	3.7 ± 0.6	4.0 ± 1.6	S	1.4 ± 1.4	MR
Cabbage	YR-Honam	4.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	R	0.2 ± 0.6	R
	Grandmart	4.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	R	0.9 ± 0.9	R
	Kkokkoma	4.0 ± 0.0	0.6 ± 1.3	R	2.9 ± 1.7	S
	Redmart	4.0 ± 0.0	0.3 ± 0.7	R	3.1 ± 1.4	S
Broccoli	Verydom	3.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	R	1.4 ± 1.1	MR
	Acedom	3.0 ± 0.0	0.1 ± 0.3	R	1.6 ± 1.2	MR
	Grandeur	4.0 ± 0.0	0.9 ± 1.6	R	2.3 ± 1.5	MR

^zFusaric acid isolated from *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 was dissolved in MeOH and adding in MESS solution, including 1 mM MES and 1% sucrose, to give 50 µg·mL⁻¹ of fusaric acid and 1% MeOH. Ten-day-old seedlings of the cultivars were treated with fusaric acid by dipping the roots of the plants in the solution. The applied plants were incubated in a growth chamber at 25°C. After 5 days, phytotoxicity of the culture filtrate was evaluated as follows: 0, healthy; 1, wilt of 1-25%; 2, wilt of 26-50%; 3, wilt of 51-80%; 4, wilt of more than 81%.

^yFourteen-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *raphani* and *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* by dipping the roots of seedlings in spore suspension of each fungus at a concentration of 1.0 × 10⁷ spores·mL⁻¹ for 0.5 h. The infected plants were incubated in a growth chamber at 25°C with 12 h light a day. After 3 weeks, disease severity of the seedlings was investigated on a scale of 0-5, where 0 = no symptoms in tops or roots; 1 = darkening of roots, no stunting or symptoms in tops; 2 = darkening of roots, slightly top stunting, no chlorosis; 3 = dark stunted roots, tops stunted, slight chlorosis; 4 = severe stunting of roots and tops, severe chlorosis; and 5 = death.

^xEach value represents the mean ± standard deviation of two runs with ten replicates each.

^wR, resistant, disease index ≤ 1.0; MR, moderately resistant, 1.0 < disease index ≤ 2.5; S, susceptible, disease index > 2.5.

이와 달리 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*가 생산하는 phytoxin인 fusaric acid는 기주인 무 유묘뿐만 아니라 이 병원균의 기주가 아닌 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*의 기주인 양배추 4개와 브로콜리 3개 품종의 유묘에도 무와 마찬가지로 높은 phytotoxicity를 보였다(Table 2). 따라서 Shahin and Spivey(1986)가 보고한 바와 같이 fusaric acid는 비기주 특이적 독소(non-host-specific toxin)임을 알 수 있었다.

병원균에 의해 분비되는 저분자량의 2차 대사산물은 식물에 독성을 유발하고 병원균이 병을 일으키는데 도움을 준다. 몇몇 병원균에 의해 생성되는 기주 특이적 독소(host-specific toxin)는 병원균의 기주에만 독성을 나타내지만, 비기주 특이적 독소는 병원균의 기주가 아닌 작물에도 phytotoxicity를 일으킨다(Kuzniak, 2001). 비기주 특이적 독소는 병원균이 병을 일으킬 때에 병 발생을 증가시키지만 병원균이 병을 일으키기 위한 필수 요소는 아닌 반면에 대부분의 기주 특이적 독소는 독소를 분비하여 병원성을 발휘한다(Greenberg and Yao, 2004; Kim et al., 1998; Kuzniak, 2001). 기주 특이적 독소인 HC 독소, *Alternaria alternata*(ALL) 독소, T 독소, victorin 등은 세포 내 작용점 및 기주 세포에 programmed cell death를 유도하는 것으로 알려져 있다(Greenberg and Yao, 2004; Kim, 1993; Wolpert et al., 2002).

무 시들음병에 대한 저항성 정도가 서로 다른 무 5개 품종 즉 저항성인 ‘명산무’, 중도저항성인 ‘청두무’와 ‘장생무’ 그리고 감수성인 ‘미농조생무’와 ‘청수궁중무’에 대한 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*가 생산한 fusaric acid의 활성(phytotoxicity)을 조사한 결과, fusaric acid는 무 시들음병의 저항성 정도와 관계없이 실험한 모든 무 품종에서 강한 독소 활성을 보였다(Table 2). Fusaric acid를 처리하고 약 48시간이 지난 후부터 본엽의 잎맥이 검게 변하며 잎이 마르기 시작하였고, 3-5일이 지나면 고사하는 반응을 보였다.

Fusaric acid를 식물에 처리하였을 때, 만약 저항성 품종이 fusaric acid를 분해하는 효소를 생산하거나 fusaric acid의 작용점이 감수성 품종과 달라서 약제가 작용점과 결합하지 못한다면 저항성 품종은 이 독소에 의해 영향을 받지 않을 것이다. 하지만 저항성 품종인 ‘명산무’에서도 fusaric acid는 감수성 품종에서와 마찬가지로 높은 활성을 보였다(Table 2). 또 저항성 품종의 뿌리를 통해 침입한 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*가 기주의 과민성 저항성 반응 덕분에 성장하지 못하게 되면 결과적으로 fusaric acid는 생산할 수 없게 될 것이고 이렇게 되면 기주는 저항성 반응을 보일 것이다. 따라서 fusaric acid는 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*에 대한 무의 저항성과 무관한 독소일 수도 있다고 생각되었다. 하지만 fusaric acid가 저항성 품종에서 기주의 저항성을 유발하

는 인자로 작용할 가능성도 있으므로 이것은 독소를 생산하지 못 하는 돌연변이체를 이용하여 확인할 필요가 있다.

이상의 결과로부터 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*가 생산하는 phytoxin인 fusaric acid는 non-host specific toxin으로 병원균의 병원성에는 역할을 하나 기주 특이적 독소는 아니며, ‘명산무’와 같이 고도의 저항성 품종에도 독성을 나타내므로 무 시들음병에 대한 무의 저항성을 검정할 경우에는 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*를 배양한 후에 원심분리하여 독소를 제거한 포자현탁액을 접종원으로 사용하는 것이 반드시 필요하다는 것을 알 수 있었다.

초 록

무 시들음병에 대한 저항성 검정 체계를 확립하기 위하여 실험하는 과정에서 병원균인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*가 무 유묘에 독성(phytotoxicity)을 일으키는 독소(phytoxin)를 생산한다는 것을 발견했다. *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 균주는 여러 배지 중 malt extract broth 배지에서 배양하였을 때 그리고 25°C에서 14일 동안 150rpm으로 진탕배양하였을 때 가장 많은 독소를 생산하였다. 무에 대한 독성 반응을 이용하여 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*의 배양액으로부터 phytoxin을 분리하였다. 그리고 Mass와 NMR Spectroscopy 분석을 통하여 이 화합물은 fusaric acid로 동정되었다. 독소의 역할을 규명하기 위하여 fusaric acid를 무, 양배추, 브로콜리 등 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*의 기주 및 비기주 배추과 작물에 대한 독소 활성을 조사하였다. Fusaric acid는 무 유묘에 대하여 농도 의존적으로 활성을 보였으며, *F. oxysporum* f. sp. *raphani*에 대한 감수성 품종뿐만 아니라 저항성 품종에 대해서도 유사한 정도의 독성을 나타냈다. 그리고 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*가 생산하는 fusaric acid는 병원균의 비기주 배추과 작물인 양배추와 브로콜리에 대해서도 강한 활성을 보였다. 따라서 이들 결과는 이 독소가 병원성 관련 독소이나 비기주 특이적 독소이며, 무 시들음병 저항성 검정에서 이 독소가 제거된 포자현탁액을 접종원으로 사용해야 한다는 것을 나타낸다.

추가 주요어 : 육종, fusaric acid, 비기주 특이적 독소, 시들음병

인용문헌

Abbas, H.K., C.D. Boyette, R.E. Hoagland, and R.F. Vesonder. 1991. Bioherbicidal potential of *Fusarium moniliforme* and its phytoxin, fumonisin. *Weed Sci.* 39:673-677.

- Agrios, G.N. 2005. Genetics of plant disease, p. 163-164. In: Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press, Burlington, USA.
- Amalfitano, C., R. Pengue, A. Andolfi, M. Vurro, M.C. Zonno, and A. Evidente. 2002. HPLC analysis of FA, 9, 10-dehydrofusaric acid, their methyl esters, toxic metabolites from weed pathogenic *Fusarium* species. *Phytochem. Analysis* 13:277-282.
- Bacon, C.W., J.K. Poter, W.P. Norred, and J.F. Leslie. 1996. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4039-4043.
- Baik, S.-Y., K.S. Jang, Y.H. Choi, J.-C. Kim, and G.J. Choi. 2011. Resistance degree of radish cultivars to *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* according to several conditions. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 29:48-52.
- Burmeister, H.R., M.D. Grove, R.E. Peterson, D. Weisleder, and R.D. Plattner. 1985. Isolation and characterization of two new fusaric acid analogs from *Fusarium moniliforme* NRRL 13,163. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:311-314.
- Capasso, R., A. Evidente, A. Cutignano, M. Vurro, M.C. Zonno, and A. Bottalico. 1996. Fusaric and dehydrofusaric acids and their methyl esters from *Fusarium nygamai*. *Phytochem.* 41:1035-1039.
- Davis, D. 1969. Fusaric acid in selective pathogenicity. *Phytopathology* 59:1391-1395.
- Desjardins, A.E. and T.M. Hohn. 1997. Mycotoxins in plant pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:147-152.
- Gaumann, E. 1957. Fusaric acid as a wilt toxin. *Phytopathology* 47:342-357.
- Greenberg, J.T. and N. Yao. 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* 6:201-211.
- Hershenhorn, J., S.H. Park, A. Stierle, and G.A. Strobel. 1992. *Fusarium avenaceum* as a novel pathogen of spotted knapweed and its phytotoxins, acetamido-butenolide and enniatin B. *Plant Sci.* 86:155-160.
- Idris, A.E., M.A. Abouzeid, A. Boari, M. Vurro, and A. Evidente. 2003. Identification of phytotoxic metabolites of a new *Fusarium* sp. inhibiting germination of *Striga hemonthica* seed. *Phytopathol. Mediterr.* 42:65-70.
- Kendrick, J.B. and W.C. Snyder. 1936. A vascular *Fusarium* disease of radish. *Phytopathology* 26:98.
- Kern, H. 1972. Phytotoxins produced by Fusaria, p. 35-48. In: R.K.S. Wood, A. Balili and A. Graniti (eds.). *Phytotoxins in plant disease*. Academic Press, New York.
- Kim, B.R., H.W. Kang, S.H. Yu, Y. Itho, and K. Kohmoto. 1998. RAPD analysis of host-specific toxin (HST) producing *Alternaria* species. *Korean J. Plant Pathol.* 14:92-98.
- Kim, S.D. 1993. Studies on the mode of action of HC-toxin (I). *Korean Biochem. J.* 26:51-53.
- Kuzniak, E. 2001. Effects of fusaric acid on reactive oxygen species and antioxidants in tomato cell cultures. *Phytopathology* 149:575-582.
- Lee, S.J., M.H. Kim, S.S. Oh, and H.S. Chun. 2012. Trends in researches of *Fusarium* mycotoxins, T-2 toxin and HT-2 toxin in domestic and foreign countries. *J. Fd Hyg. Safety* 27:1-17.
- Luz, J.M., R.R.M. Paterson, and D. Brayford. 1990. Fusaric acid and other metabolite production in *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 11:141-144.
- Marasas, W.F., P.E. Nelson, and T.A. Toussoun. 1984. *Toxigenic Fusarium species*. The Pennsylvania State University Press, Pennsylvania.
- Moon, Y.G., W.G. Kim, W.D. Cho, and J.M. Sung. 2001. Occurrence of *Fusarium* wilt on cruciferous vegetable crops and pathogenic differentiation of the causal fungus. *Res. Plant Dis.* 7:93-101.
- Nam, S.H. 1994. Inheritance and breeding of *Fusarium* yellow resistance in radish. PhD Diss., ChungNam Natl. Univ., Daejeon, Korea.
- Peterson, J.L. and G.S. Pound. 1960. Studies on resistance in radish to *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. *Phytopathology* 50:807-816.
- Placinta, C.M., J.P.F. D'Mello, and A.M.C. Macdonald. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78:21-37.
- Porter, J.K., C.W. Bacon, and W.P. Norred. 1990. Effects of *Fusarium moniliforme* and corn associated with equine leukoencephalomalacia on rat neurotransmitters and metabolites. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 194:265-269.
- Pound, G.S. 1959. Red Prince is new radish. *Wis. Univ. Agric. Exp. Sta. Bull.* 538:93.
- Pound, G.S. and D.L. Fowler. 1953. *Fusarium* wilt of radish in Wisconsin. *Phytopathology* 43:277-280.
- Shahin, E.A. and R. Spivey. 1986. A single dominant gene for *Fusarium* wilt resistance in protoplast-derived tomato plants. *Theor. Appl. Genet.* 73:164-169.
- Song, H.H., J. Kim, and C. Lee. 2006. A review of mycotoxins from *Fusarium* species. *Safe Food* 1:19-28.
- Smith, T.K. and M.G. Soudias. 1993. Fusaric acid content of swine feedstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 41:2296-2298.
- Van Asch, M.A.J., F.H.F. Rijkenberg, and T.A. Coutinho. 1992. Phytotoxicity of fumonisin B₁, moniliformin and T-2 toxin in corn callus cultures. *Phytopathology* 82:1330-1332.
- Van Peer, R., T. Xu, H. Rattink, and B. Schippers. 1988. Biological control of carnation wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in hydroponic system. *ISOSC Proc.* 361-373.
- Vesonder, R.E. and P. Golinski. 1989. Metabolites of *Fusarium*, p. 1-39. In: J. Chelkowski (ed.). *Fusarium-mycotoxins, taxonomy and pathogenicity*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Wakulinski, W. 1989. Phytotoxicity of *Fusarium* metabolites in relation to pathogenicity, p. 257-268. In: J. Chelkowski (ed.). *Fusarium-mycotoxins, taxonomy and pathogenicity*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Wolpert, T.J., L.D. Dunkle, and L.M. Ciuffetti. 2002. Host-selective toxins and avirulence determinants: What's in a name? *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:251-285.
- Yabuta, T., K. Kambe, and T. Hayashi. 1937. Biochemistry of the bakanae fungus. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 10:1059-1068.
- Zonno, M.C., M. Vurro, A. Evidente, R. Capasso, A. Cutignano, and J. Sauerborn. 1996. Phytotoxic metabolites produced by *Fusarium nygamai* from *Striga hermonthica*, p. 223-226. In: Proc. IX. Int. Symp. on biological control of weeds. Stellenbosch, South Africa.