*Ampelomyces*의 생리적 특성 및 길항능력

김지영 · 이왕휴* · 김형무

전북대학교 농업생명과학대학 (식물의학연구센터)

Physical Characteristics and Antagonistic Effect of *Ampelomyces*

Ji-Young Kim, Wang-Hyu Lee* and Hyung-Moo Kim

Plant Medical Research Center, College of Agriculture and Life Science, Chonbuk National University,
Dukjin-Dong, Dukjin-gu, Jeonju, Chonbuk 561-756, Korea

(Received on April 1, 2009; Accepted on April 10, 2009)

During the period of June, 2005 to May, 2008, 44 host plants infected with powdery mildew were collected in the Jeon-ju and Jang-su districts of Jeonbuk province and in the Jang-sung district of Jeonnam province. The hyperparasites, *Ampelomyces* were confirmed in 12 plant species. Most of the pycnidium shapes of *Ampelomyces* were circular or oval shaped, and the sizes were different even within the same host plant, and also the color of pycnidium was ranged from light brown to dark brown. *Ampelomyces* species were isolated from 4 hosts including *Impatiens balsamina* L., *Cucurbita pepo*, *Rudbeckia laciniata* var. *elatier* and *Youngia sonchifolia*, and thus the most appropriate 12 *Ampelomyces* strains for the current experiment were selected. When analyzing the selected 12 strains' incubational and nutritional characteristics, the malt extract agar was the most appropriate media. When investigating the effect of osmotic pressure on the spore germination, 0.15M NaCl concentration was the optimum germination concentration. When the isolated *Ampelomyces* sp. was tested *in-vitro*, it was found to be effective to control in other plant pathogens, isolated *Ampelomyces* showed no pathogenicity to the plant. strains isolated . studied on rDNA ITS sequence analysis. The rDNA ITS sequence data of *Ampelomyces* sp. isolate BSLAH16 from *Impatiens balsamina* L. were analyzed and identified.

Keywords : *Ampelomyces*, Hyperparasite, Powdery mildew, Pycnidia fomatation, rDNA ITS sequence, Spore germination

흰가루병은 식물의 잎, 가지, 꽃, 과실에 발생하며 전세계적으로 10,000여종의 식물에서, 우리나라에서는 300여종의 식물에서 발생하고(이, 1999), 흰가루병을 일으키는 병원균은 14속 108종으로 보고되어 있다(Shin, 2000). 흰가루병은 식물체의 표면에 기생하며 신초에 많이 발생하여 기형을 만들거나 양분수탈이 심하다. 흰가루병에 대한 방제법으로 여러 약제 등이 보고되었지만 약제 내성 병원균의 출현으로 인해 방제가 어려워지고 있다(김 등, 1999).

최근에 다른 생물체를 이용하여 병원체의 집단을 부분적 또는 전체적으로 저해시키는 생물방제법이 두각을 나타내고 있다(Agrios, 2006). 식물병해를 일으키는 병원균

을 각종 미생물로 방제하는 생물방제 방법은 농약이나 기타 화학방제의 부작용을 줄일 수 있고, 인체에 해가 적으며, 농약 사용에 드는 비용과 견주어 방제 비용이 적게 드는 이점이 있다(김 등, 2006).

본 논문에서는 흰가루병균에 기생하는 *Ampelomyces*의 기주별 분포를 조사하고, 분리된 균주의 생리적 특성 조사와 *Ampelomyces*가 식물에 병을 일으키는지 여부를 조사하였다. 또한 실험에 사용한 대표 균주 BSLAH16의 rDNA ITS 영역의 PCR 증폭 및 염기서열을 분석하여 동정하였다.

재료 및 방법

***Ampelomyces*의 분포 조사.** 2005년 6월부터 2008년 5월까지 주로 전북 장수, 진안, 전주, 전남 장성 등에서

*Corresponding author

Phone) +82-63-270-2530, Fax) +82-63-270-2531

Email) whlee@chonbuk.ac.kr

흰가루병 발생여부를 조사하였다. *Ampelomyces*가 흰가루병균에 중생기생하고 있는지의 여부는 육안으로 판단하기가 불가능하여 이병개체를 채집하였다. 채집 후 습식 처리로 시료가 마르지 않게 하고, 병반을 해부현미경으로 관찰하였다. *Ampelomyces*의 병자각이 존재하는 부위를 광학 현미경으로 관찰하여 *Ampelomyces*의 유무를 확인하였다.

Ampelomyces 분리. 해부현미경(10×0.5~5)으로 관찰하면서 미침으로 *Ampelomyces*의 병자각을 하나씩 떼어내었다. 항생제(tetracycline)를 첨가한 Malt extract 평판배지에 병자각을 각각 1개씩 올려놓고 유리봉으로 도말하여 병포자 유출을 유도하였다. 배양 24시간 후부터 광학현미경으로 관찰하여 포자가 발아하는 부위를 다른 배지위에 치상하여 단포자 분리 하였다.

배지의 종류와 균종크기. 배지는 Potato dextrose agar (PDA), Oatmeal agar(OMA), M2 agar(M2A), A&H agar(AHA)(Mhaskar, 1974), Malt extract agar(MEA), Yeast extract agar(YEA), Barley extract agar(BEA), Race agar(RA), Wheat bran extract agar(WBA), Nutrient agar(NA) 등을 이용하였다. 분리된 *Ampelomyces* 균사 선단을 직경 4 mm cork-borer로 잘라내고 각 배지 위에 치상하여 28°C 항온배양기 배양하면서 35일간 균사의 생육을 관찰하였다.

삼투압과 포자발아. 물한천배지(WA)에 삼투압 조절 시료로서 NaCl과 Sucrose의 농도를 각각 0.05M, 0.15M, 0.30M, 0.45M로 조절하여 배지를 만들었다. 균주의 병자각을 떼어내어 MEA배지 위에 치상 후, 유리봉으로 도말하여 28°C 항온기에서 배양하며 6시간 간격으로 관찰하였다.

길항력 검정. JSG1-1, JSG4-1, JSG4-4, JSG6-1, JSG6-3, JSG8-4, Na2, Na7-1, BSLAH06, BSLAH16, BSLAH06-4, BSLAH31, BSLAH32 균주로 항균테스트를 하였다. 병원균으로 벼 이삭마름병균에서 분리한 균주 *Fusarium graminearum* 6001(F.g.6001)과 *F. graminearum* 6002(F.g.6002), 아이비 역병균 *Phytophthora cinnamoni*(PCI01)과 *P. nicotianae*(PNI02)를 사용하였다. 분리균주를 선접종하고 5일 후 병원균을 대치 배양한 처리구와 동시접종과의 항균효과를 비교하였다.

식물에 대한 병원성. *Ampelomyces*가 분비하는 효소 또는 기타 물질에 대한 식물체의 이상을 조사하기 위해 흰가루병에 걸리지 않은 배롱나무와 으름덩굴, 주키니호박 앞에 분리된 *Ampelomyces*를 분무 접종하여, 식물체의 반응 여부를 관찰하였다.

rDNA ITS 영역 PCR 증폭 및 염기서열 분석. rDNA ITS 영역의 염기서열 분석에 사용된 균주 BSLAH16은 MEA에서 3주 동안 배양하였으며, 배지위에 형성된 균총

에서 genomic DNA를 분리하였다. gDNA는 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 이용하여 분리하였으며, ITS1, 4 primer(White 등, 1990)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 10분간 pre-denaturation 한 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분 30초간 polymerization을 35회 반복하고, 72°C에서 7분간 유지하였다. PCR 증폭산물은 PCR purification kit(Core-one™, Korea)를 이용하여 정제한 후 염기서열 분석에 사용하였다. 염기서열 분석은 BioDye Terminator Ver. 1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 ABI 3130 autosequencer(Yun 등, 2007)에서 수행하였다.

rDNA ITS 영역에 대한 phylogenetic tree는 MEGA v4.0 (Saitou and Nei, 1987; Tamura 등, 2007)에서 neighbor-joining method로 얻은 data를 기초로 분석하였다. 또한 sequence distance는 Tamura-Nei parameter model로 계산하였으며, Bootstrap analysis는 1,000 반복으로 수행하였다(Hong 등, 2008). 균주 BSLAH16의 염기를 NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST search를 통해 GenBank에서 유사한 염기서열을 비교하였다(Kim 등, 2008).

결과 및 고찰

Ampelomyces의 분포 조사 및 분리. 전라북도 및 전라남도 일대에서 흰가루병에 걸린 총 44종의 식물을 채집하였으며, 이 중 *Ampelomyces*가 기생하고 있는 식물은 12종이었다(Table 1). *Ampelomyces* 병자각의 형태는 대부분이 구형이었다. 전자현미경으로 관찰하였을 때 주키니호박의 *Ampelomyces* 병자각의 크기가 69.9×33.1~51.1×36.8 μm이었고, 봉선화에서는 66.9×43.7~45.2×32.0 μm 등 크기가 다양했다(Fig. 1). 광학현미경으로 관찰하였을 때 병자각이 터져 포자가 유출되는 것을 확인할 수 있었고, 포자가 한쪽 면에서 유출되는 것이 관찰 되었는데 이는 Linnemann(1968)과 Lee 등(1999)의 보고와 유사하였다.

Ampelomyces 병자각으로 단포자 분리한 결과 봉선화에서 18개, 고들빼기에서 15개, 주키니호박에서 8개, 삼잎국화에서 4개의 균주를 분리하였다(Table 2).

채집된 흰가루병 이병개체 중 기주가 보고되지 않은 식물은 긴산꼬리풀, 파리, 주키니호박, 중국단풍, 도둑놈의 갈고리, 세잎평의비름, 큰산꼬리풀, 모감주나무 등이 있다. 따라서 향후 이들 기주에 대한 흰가루병균의 동정이 요구된다.

배지의 종류에 따른 균의 생육. 배지의 종류에 따라 *Ampelomyces*의 균사생장과 병자각 형성이 다르게 나타났

Table 1. Hyperparasitic ability of the genus *Ampelomyces* on the various plants with powdery mildew fungi

Host plant		Degree of <i>Ampelo-</i> <i>myces</i>
Korean name	Scientific name	
가지	<i>Solanum melongena</i> L.	-
개 망초	<i>Erigeron annuus</i>	-
개 밀	<i>Agropyron tsukushiense</i>	++
고들빼기	<i>Youngia sonchifolia</i>	++++
긴산꼬리풀	<i>Pseudolysimachion longifolium</i>	-
파리	<i>Physalis alkekengi</i> var. <i>franchetii</i>	++
담쟁이덩굴	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	-
오미자	<i>Schizandra chinensis</i> Baill.	-
사철쭉	<i>Artemisa capillaris</i> Thunb.	-
딸기	<i>Fragaria ananassa</i>	-
사철나무	<i>Euonymus japonica</i>	-
왕고들빼기	<i>Lactuca indica</i> var. <i>lacinita</i>	++++
배롱나무	<i>Lageratromia indica</i> L.	+++
봉선화	<i>Impatiens balsamina</i> L.	++++
박하	<i>Mentha arvensis</i> var. <i>piperascens</i>	-
팔	<i>Phaseolus angularis</i>	+
세콩	<i>Amphicarpaea edgeworthii</i> var. <i>trisperma</i>	-
쭈키니호박	<i>Cucurbita pepo</i>	++++
방울토마토	<i>Lycopersicon esculentum</i>	-
물푸레나무	<i>Fraxinus rhynuchophylla</i>	-
큰영경귀	<i>Cirsium pendulum</i>	-
폴협죽도	<i>Phlox paniculata</i>	++
용담	<i>Gentiana scabra</i> var. <i>buergeri</i>	-
감나무	<i>Diospyros kaki</i> Thunb.	-
질경이	<i>Plantago asiatica</i> L.	-
생강나무	<i>Lindera pbtusiloba</i> Blume	-
으름덩굴	<i>Akebia quinata</i> Dicne.	-
중국단풍	<i>Acer buergerianum</i>	-
도둑놈의갈고리	<i>Desmodium oxyphyllum</i>	-
찔레	<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	-
참쭉	<i>Artemisa lavanduledfolia</i>	-
소리쟁이	<i>Rumex crispus</i>	-
다알리아	<i>Dahlia pinnata</i> Cav.	-
감나무	<i>Diospyros kaki</i> Thunb.	-
생강나무	<i>Lindera pbtusiloba</i> Blume	-
으름덩굴	<i>Akebia quinata</i> Dicne.	-
익모초	<i>Leonurus sibiricus</i> L.	-
쭉	<i>Artemisia princeps</i> var. <i>orientalis</i>	-
모감주나무	<i>Koeireuteria paniculata</i>	-

* - : No infection, + : Infection less than 5% by *Ampelomyces*, ++ : 6-49%, +++ : 50-85%, ++++ : 90% over.

는데, PDA, NA, YEA에서 많은 병자각이 형성되었다(Table 3). YEA는 병자각 형성이 많고 균사의 생장이 좋았으나, 14일 후에 배지 표면이 갈라지기 시작했다. 병자각의 형성은 적었으나 균사의 생장력이 좋은 RA나 BEA 등과 비교했을 때, 병자각 형성시 많은 수분이 필요하다고 생각된다. 12종의 균주의 생장을 10종류의 배지별로 실험한 결과 MEA에서 *Ampelomyces*의 균사의 신장과 병자각의 형성량 등 두 가지 모두가 양호 하였다. Mhaskar(1974)는 *Ampelomyces* 6종의 균주를 여러 배지에서 배양한 결과 M2A에서 가장 생육이 좋았고, PDA에서도 생장이 좋다고 보고하였다. 그의 실험에서는 A&HA 배지에서 균사 신장 및 병자각이 많이 형성된다고 보고하였지만, 본 실험에서는 전혀 균사 신장이 없어서 Mhaskar(1974)의 보고와는 다른 결과를 나타냈다. Lee(1999)는 분리균주 AQ94013이 V8 Juice agar에서 가장 균사생육이 좋고 Leoninan agar, Neopeptone glucose agar, PDA에서 병자각 형성이 많다고 보고하였는데 본 실험의 분리균주는 MEA에서 균사가 가장 잘 자랐고, YEA와 PDA에서 병자각 형성이 많았다(Table 4).

삼투압과 포자발아. 실험균주 포자는 WA에 NaCl과 sucrose의 농도를 조절 한 배지에서 배양 16시간 후부터 발아되기 시작하였다. 배양 24시간 후 발아율을 측정했을 때 0.15M에서 발아율이 평균 67.31%로 가장 높았고 포자의 크기 및 균사의 길이가 가장 길었다. 0.30M은 0.15M에 비해 발아율이 심하게 낮아져 대부분의 발아율이 20% 미만이었지만, 48시간 이후에는 발아가 많이 되었다(Table 5, Fig. 2) 0.45M에서의 포자의 모양은 구형이었다가 수분이 줄어들어 길쭉해졌고 발아율은 10% 미만이었다. 이에 비해 발아율이 균주에 따라 28~99%로 높았던 0.05M과 0.15M에서 포자 모양은 더 구형으로 변해 있었다. 포자의 모양 변화는 농도가 높아짐에 따른 단순한 삼투현상에 기인한 것으로 생각된다. 이 결과로 보아 *Ampelomyces*의 최적 삼투압 농도 범위는 NaCl 1.2~3.7 기압이었다. Sasaki와 Kobayashi(1976)가 *Monochaetia* 포자로 실험한 결과 두 성분을 0.05M과 0.15M 첨가하였을 때 발아율이 최고치를 나타내었다는 보고와는 약간 달랐다.

Sucrose의 첨가는 NaCl 첨가에 비해 뚜렷하지 않았는데 (본 논문에서는 데이터를 표시 하지 않음) 이는 Sasaki와 Kobayashi(1976)의 결과와 비슷하였다.

길항력 검정. 여러 식물 병원성 균류와 *Ampelomyces* 분리균주를 동시접종한 결과 배양 5일 후부터 PCI 01, PNI 02 균주와 대치 배양한 배지에서 약한 저지원 현상을 관찰할 수 있었다. 균주 *F. g.* 6001과 *F. g.* 6002는 생장속도가 무척 빨라 이들 균에 의해 배지가 우점 당했다.

Fig. 1. The morphological features of *Ampelomyces* pycnidia and pycnidiospores observed by an optical microscope and a scanning electron microscope. Pycnidia and pycnidiospores on *Impatiens balsamina* (A) and *Lactuca indica* var. *lacinita* (B) observed by using an optical microscope ($\times 10$ - $\times 40$). Pycnidia and pycnidiospores on *I. balsamina* (C, D) observed by using a scanning electron microscope ($\times 300$ - $\times 6000$).

Table 2. List of isolated *Ampelomyces* strains from various host plants

<i>Ampelomyces</i> Isolate	Host	Location	Year
BSLAH06-4	Balsam	Jeonbuk Jeon-ju	2007
BSLAH16	Balsam	Jeonbuk Jeon-ju	2007
JSGNa1-1	Korean wild lettuce	Jeonnam Jang-seoung	2007
JSGNa4-1	Korean wild lettuce	Jeonnam Jang-seoung	2007
JSGNa4-4	Korean wild lettuce	Jeonnam Jang-seoung	2007
JSGNa6-3	Korean wild lettuce	Jeonnam Jang-seoung	2007
JSGNa8-4	Korean wild lettuce	Jeonnam Jang-seoung	2007
Na1-4	Jucchini	Jeonbuk Jang-su	2007
Na2	Jucchini	Jeonbuk Jang-su	2007
JukiB	Jucchini	Jeonbuk Jang-su	2008
RudB	Golden glow	Jeonbuk Jeon-ju	2008
RudC	Golden glow	Jeonbuk Jeon-ju	2008

그러나 *F. g.* 6001 균의 균사에 완전히 덮여있는 상태에서도 *Ampelomyces* 분리균주는 배지 안쪽에서 계속 자라고 있었으며, 시간이 4주 정도 흐르자 *F. g.* 6001 균주의 색이 붉은색에서 황색으로 변하여 대조균과 비교했을 때 다른 것이 관찰되었다. 배양 30일 후 *F. g.* 6001의 균사가 특히 BSLAH16, Na2, JSGNa6-3, JSGNa8-4 등의 균주와 대치배양 시킨 배지에서 균사의 양이 점차 줄어들고 균의 색이 변하는 것이 육안으로 쉽게 관찰할 수 있었다.

Ampelomyces 분리균주를 병원균보다 5일 먼저 접종한 배지는 배양 3일 후 저지원 현상이 미약하게 나타나기 시작했다. *F. graminearum* 균주들은 성장속도가 *Ampelomyces*에 비해 매우 빠른 편이었지만 중복기생 균주를 먼저 접종하면 *F. graminearum* 균주들의 성장 속도가 동시에 접종에 비해 현저하게 낮아졌으며, 균주 Na2, BSLAH06, BSLAH16에서는 *F. graminearum* 균주 및 *Phytophthora* 균주의 생육을 억제하는 현상이 뚜렷하게 관찰되었다. 특히

Table 3. Mycelial growth of 12 different strains of *Ampelomyces* spp. in various media 28 days after incubation (mm)

	PDA	OMA	M2A	A&H	BEA	NA	MEA	RA	WBA	YEA
RudB	15	17	c	0	15	9	14	30	19	17
RudC	12	20	c	0	12	12	15	31	18	17
JukiB	24	21	36	7	22	17	30	26	26	31
JSGNa1-1	37	21	31	16	41	17	51	43	37	40
JSGNa4-1	17	28	31	11	26	11.5	38	31	31	26
JSGNa4-4	28	22	c	0	30	12	42	35	31	43
JSGNa6-3	37	23	30	9	35	16	49	44	29	51
JSGNa8-4	20	28	30	0	c	17	41	34.5	32	34
Na1-4	25	20	28	10	31	15	38	38	33	40
Na2	37	27	31	18	38	17	48	53	37	46
BSLAH06-4	30	25	33	0	36	13	41	30	34	29
BSLAH16	21	33	26	0	29	14	39	39	32	35

Table 4. Pycnidium formation of 12 different strains of *Ampelomyces* spp. in several media 28 days after incubation (mm)

	PDA	OMA	M2A	A&H	BEA	NA	MEA	RA	WBA	YEA
RudB	±*	±	—	—	±	±	++	±	±	++
RudC	±	—	—	—	±	±	±	++	±	++
JukiB	+++	++	±	—	++	++	++	++	++	+++
JSGNa1-1	+++	±	—	—	++	+++	++	±	++	++
JSGNa4-1	+++	++	—	—	±	++	++	++	+++	+++
JSGNa4-4	+++	++	++	—	++	+++	++	++	+++	+++
JSGNa6-3	+++	++	—	—	++	±	+++	++	++	+++
JSGNa8-4	++	±	—	—	—	—	+++	++	±	+++
Na1-4	+++	—	±	—	++	—	+++	++	±	+++
Na2	++	±	—	—	++	+++	+++	++	++	++
BSLAH06-4	+++	±	—	—	++	++	+++	++	++	+++
BSLAH16	+++	±	±	—	±	±	++	++	±	+++

* —: No formation, ±: Few, ++: Normal, +++: Dominant.

Table 5. Relationship of different strains of *Ampelomyces* spp. spore germination rate(%) and osmotic pressure by NaCl concentration (after 24 hrs at 28°C)

Isolates	Concentration 0.00M (Control)	0.05M	0.15M	0.30M	0.45M
JukiB	95.77	94.07	85.00	3.92	0.00
BSLAH06-4	0.00	44.18	27.69	5.37	4.70
BSLAH16	49.04	50.00	60.60	11.97	5.76
JSGNa1-1	28.84	28.57	28.57	20.75	7.5
JSGNa4-1	20.83	46.28	59.25	6.06	2.68
JSGNa4-4	29.75	60.44	89.52	23.23	5.30
JSGNa6-3	34.93	46.06	82.94	4.17	3.15
JSGNa8-4	30.08	66.98	79.41	2.36	2.47
Na1-4	38.09	72.42	61.29	4.04	2.78
Na2	60.66	96.70	99.12	14.49	7.22

Fig. 2. The germination degree of Na₂ by NaCl concentration (A, B, C, D and E = 1 horizontal line indicates 24 hours after incubation. F, G, H, I and J = horizontal line indicates 48 hours after incubation.).

Table 6. Sequence identity percent of rDNA ITS region from BSLAH16 with other *Ampelomyces* spp. grouped in GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1		77.1	84.8	82.2	79.0	75.9	76.0	92.2	76.2	85.2	74.9	100	100	100	100	99.8	99.8	30.6
2			80.7	72.2	71.6	97.0	97.0	76.6	95.6	81.2	98.9	77.8	77.8	77.8	77.8	77.5	77.8	33.3
3				83.7	83.7	80.0	79.8	82.1	80.8	99.6	78.5	85.0	85.0	85.0	85.0	84.8	85.2	36.3
4					94.5	71.1	71.2	81.0	73.7	84.3	69.8	82.0	82.0	82.0	82.0	81.8	82.2	35.5
5						71.6	71.7	83.9	76.4	84.1	73.4	79.2	79.2	79.2	79.2	79.0	83.7	37.1
6							99.5	76.8	94.7	80.9	96.6	76.4	76.4	76.4	76.4	76.1	76.4	33.0
7								76.6	94.3	80.7	96.4	76.4	76.4	76.4	76.4	76.2	76.4	32.9
8									75.7	82.6	74.3	92.2	92.2	92.2	92.2	91.9	91.9	34.6
9										81.7	96.1	76.4	76.4	76.4	76.4	76.2	76.7	33.2
10											78.9	85.4	85.4	85.4	85.4	85.2	85.7	36.7
11												74.3	74.3	74.3	74.3	74.1	74.3	32.2
12													100	100	100	99.8	99.8	30.6
13														100	100	99.8	99.8	30.6
14															100	99.8	99.8	30.6
15																99.8	99.8	30.6
16																	99.8	30.4
17																		30.6
18																		

1, BSLAH16; 2, AF035778; 3, AF035780; 4, AF126817; 5, AF126818; 6, AF455485; 7, AF455518; 8, AQU82449; 9, ASU82452; 10, AY663824; 11, DQ093657; 12, DQ490748; 13, DQ490749; 14, DQ490750; 15, DQ490751; 16, 490753; 17, EU526293; 18, GQ244508.

PCI 01은 *Ampelomyces* 분리군주에 의해 생육이 저지되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

식물에 대한 병원성. 식물에 대한 병원성을 조사하기 위해 *Ampelomyces*를 건전한 식물 3종에 분무 접종한 결

과 배롱나무와 으름덩굴, 주키니호박 잎에 이상이 생기거나 병이 발생하지 않았다. 따라서 분리된 *Ampelomyces*는 식물에 병원성을 가지고 있지 않기 때문에 생물방제제로서 가능성이 높다고 생각한다.

Fig. 3. Antimicrobial test for isolated strains (5 days pre-inoculation). **A, B:** *P. cinnamoni* (PCI 01), **C:** *P. nicotianae* (PNI 02), **D:** *F. graminearum*.

rDNA ITS 영역 PCR 증폭 및 염기서열 분석. *Ampelomyces* sp. BSLAH16 균주와 GenBank를 통해 기존에 등록된 sequence와 3종 17균주가 비교 분석되었다. *Ampelomyces* sp. BSLAH16 균주의 rDNA ITS를 ITS1, 4 primer로 증폭된 PCR 산물의 크기는 570 bp이었으며, DNASTAR program에 의해 정렬된 염기는 449개이었다. ITS 영역에 대한 염기서열의 상동성을 비교 분석한 결과 *Ampelomyces* sp. BSLAH16 균주는 GenBank에서 *A. quisqualis* 또는 *Ampelomyces* sp.로 동정된 DQ490748, DQ490749, DQ490750, DQ490751 균주와 100% 상동성을 보였다(Table 6). 따라서 rDNA ITS 영역에 대한 염기서열 분석결과를 바탕으로 *Ampelomyces* sp. BSLAH16 균주는 *A. quisqualis* 또는 *Ampelomyces* sp.로 동정되었다. 또한 *Ampelomyces* sp. BSLAH16 균주와 GenBank를 통

해 등록된 17종의 sequence와 phylogenetic tree 분석결과 균주 BSLAH16은 *Ampelomyces* sp.로 그룹화 되었으며, *A. humuli*, *A. quercinus*와는 다른 그룹으로 구분되었다(Fig. 4).

요 약

2005년 6월부터 2008년 5월까지 전북 장수, 전주 및 전남 장성 등에서 흰가루병에 걸린 44종의 기주식물을 채집하였으며, 12종의 식물에서 *Ampelomyces*의 중복기생이 확인되었다. *Ampelomyces*의 병자각의 형태는 대부분이 원형 또는 타원형이었으며, 같은 기주식물에서도 그 크기가 다양했고, 병자각의 색은 옅은 갈색에서 진한 갈색이었다. 봉선화, 고들빼기, 주키니호박, 삼잎국화로부터 *Ampelomyces* 균을 분리하였고, 이 중 실험에 적합한 *Ampelomyces* 균주 12개를 최종 선발하였다. 선발된 12균주의 배양적 특성 및 영양요구를 조사한 결과 Malt extract agar에서 가장 생육이 좋았다. 삼투압이 *Ampelomyces*의 포자발아에 미치는 영향에 대해 조사한 결과 Czapek dox agar에 질소원인 NaCl 0.15M을 첨가한 배지에서 포자발아율이 가장 높았다. *Ampelomyces* 분리 균의 길항 효과를 실험한 결과 다른 식물 병원균에 대한 항균효과가 있었다. 분리한 균주는 식물체에 이상이 생기거나 병이 발생하지 않아서 *Ampelomyces*는 식물에 병원성을 가지고 있지 않다는 사실을 알 수 있었다. 본 실험에 주로 사용된 균주 BSLAH16의 rDNA ITS 영역에 대한 염기서열을 분석한 결과 *A. quisqualis* 또는 *Ampelomyces* sp.로 동정되었다.

Fig. 4. Phylogenetic tree of rDNA ITS sequence from *Ampelomyces* sp. and other reference sequences obtained from GenBank (by Laser gene 7.0). Bootstrap values were represented under each branch. Three species sequence of *Ampelomyces* spp. are classified as an out-group.

사 사

영문교정에 수고를 아끼지 않은 S. Manion(Massey University)과 전북대 류경선 교수에게 감사를 표하고, 군주의 동정 실험에 도움을 주신 전라북도 농업기술원 친환경농업과 병해충방제실 최인영 박사님께 감사드립니다.

참고문헌

- Agrios, G. N. 2006. 식물병리학 제5판 pp. 208-246.
- Heijwegen, T. 1988. Effect of seventeen fungicides fungi on sporulation of cucumber powdery mildew. *Neth. J. Pl. Path.* 94: 185-190.
- Hong, S. K., Kim, W. G., Yun, H. K. and Choi, K. J. 2008. Morphological variations, genetic diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing grape ripe rot in Korea. *Plant Pathol. J.* 24: 260-278.
- 김경희, 남옥, 허재선, 염규진, 고영진. 2006. 차나무검둥근무늬병 방제용 *Bacillus subtilis* BD0310의 대량배양 최적조건. *식물병연구* 12: 85-90.
- 김형무, 박창석, 엄재열, 유승현, 최장경, 최재을. 1999. 신제식물병리학. pp. 288-289.
- Kim, J. T., Park, S. Y., Choi, W. B., Lee, Y. H. and Kim, H. T. 2008. Characteristics of *Collectotrichum* isolates causing anthracnose of pepper in Korea. *Plant Pathol. J.* 24: 17-23.
- 이배함. 1976. 한국의 Mycoparasitic Fungi에 관하여. *건국대학교 이학논문집* 2: 7-11.
- Linnemann, G. 1968. *Ampelomyces quisqualis* Ces., ein Parasit auf Mucorineen. *Archiv- fur Mikrobiologie* 60: 59-75.
- 이상엽. 1999. 중북기생균 *Ampelomyces quisqualis*를 이용한 오이 흰가루병의 생물학적 방제. 충남대 박사학위논문.
- 이상엽, 류제당, 김홍기. 2005. *Ampelomyces quisqualis* 94013의 배양적 특성. *식물병연구* 11: 173-178.
- Mhaskar, D. N. 1974. Mycoparasite-*Ampelomyces* in artificial culture I. Morphology and cultural behaviour. *Mycopathologia et Mycologia applicata* 52: 55-64.
- Patwardhan, P. G. 1965. Factors affecting the development of the perithecial stage of powdery mildew of *Helianthus annuus* L. in India. *Mycopathologia* 27: 3-4.
- Rankovic Branislav. 1997. Hyperparasites of the genus *Ampelomyces* on powdery mildew fungi in Serbia. *Mycopathologia* 139: 157-164.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sasaki, K. and Kobayashi, T. 1976. Resinous canker disease of Cupressaceae caused by *Monochaetia unicornis* (II) Physiologic characters of the causal fungus. *Annual Report of Forestry Experiment Station* 280: 57-68.
- Shin, H. D. 2000. Erysiphaceae of Korea I. Nat. Inst. Agric. Sic. Tech, Suwon, Korea. 320 pp.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis(MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Acids. Res.* 22: 4673-4680.
- Yun, H. Y., Kim, Y. H., Hong, S. K. and Lee, K. J. 2007. First description of *Coleosporium plectranthi* causing perilla rust in Korea. *Plant Pathol. J.* 23: 7-12.
- White, J. J., Bruns, J., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic press, pp. 315-322.