

사과나무 腐爛病菌 *Valsa ceratosperma*에서의 Auxotrophic Mutants 의 檢出¹⁾

洪淵圭 · 嚴在烈

慶北大學校 農科大學 農生物學科

Detection of Auxotrophic Mutants form *Valsa ceratosperma*, the Causal Fungus of Apple Canker

Hong, Yeon Gyu · Uhm, Jae Youl

Dept. of Agric., Biology, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

Summary

This study was conducted to elucidate the most appropriate method to obtain auxotrophic mutants from *Valsa ceratosperma*, the causal fungus of apple canker, which may be used as a gene marker in detecting the transfer of the factors of avirulent strains to virulent strains.

Among the 3 kinds of synthetic media tested, each have two formula for minimal and complete, the medium which has been used in study of *Endothia parasitica* (E. P medium) was turned out to be most appropriate for the growth of *V. ceratosperma*. A medium for single colony formation from pycnidiospore of this fungus was developed by adding 0.5% L- sorbose to the E. P minimal medium.

The period of incubation in dark for preventing the photoreactivation after U. V irradiation was estimated as about 60hrs at which most of the spores become binucleate.

Largest number of putative auxotrophs were obtained at about 50second of irradiation to the spores smeared on the medium for single colony formation, at which the survival rate of spores was 5 to 6 percent.

With these method developed in this experiment, 161 isolates of putative auxotrophs were detected among which the nutrient requirement for 10 isolates were determined. Five out of 10 mutants were still virulent to apple tree and all but one could not sporulate.

緒 論

사과나무 腐爛病은 현재 우리나라와 일본의 사과재배상 큰 위협이 되고 있으나 이 병에 대해 즉

각적이고 효율적인 防除對策은 아직 마련되어 있지 않다. 그런데 최근 사과나무 腐爛病과 유사한 병害인 밤나무 동고병에서 hypovirulence를 이용한 생물학적 방제에 대한 연구가 활발히 진행되

1) 本 研究은 1985年度 韓國科學財團 一般研究費에 依해 遂行된 研究의 一部임.

고 있으며^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11}, 이태리, 프랑스에서는 이미 실용화 되어 큰 성과를 얻고 있다.

Hypovirulent계통은 그 자체가 非病原性 내지는 弱病原性이며 同一種內的 다른 病原性 菌株와 공존하면 균주에 따라 그 인자가 病原性 菌株로 전이되어 病原性 菌株는 hypovirulence로 전환하게 된다.¹² 사과나무 부란병에서도 이와 유사한 hypovirulence가 존재할 것으로 보고 전국 일원의 사과 재배지역에서 다수의 病害標本을 채집, 균을 분리한 결과, hypovirulence의 가능성이 있는 것이 5균주 검출되었다. 이들 5균주는 형태적으로 사과나무 부란병과 약간 차이가 있으며 사과나무에 대해서는 완전한 비병원성이었다. 本研究는 이들 비병원성 *Valsa*屬의 인자가 사과나무 부란병균에 전이 될 수 있는지의 여부를 밝히기 위한 gene marker로 쓰일 營養要求突然變異株를 검출하는 기본과정을 수립하기 위해 수행되었다.

材料 및 方法

1. 供試菌株

본 실험에 사용된 供試菌株로는 전국 일원에서 분리한 총 1200여 균주중 채집지역, 菌叢의 형태 등을 고려하여 선발한 病原性 M26 등 4균주와 非病原性인 MA795등 모두 5균주를 供試하였다. 이들을 高壓殺菌한 사과나무 잎에 접종, 형성된 柄胞子로 單胞子계통을 분리하여 공시하였다. 공시균주의 상세한 기재는 Table 1과 같다.

2. 基礎合成培地の 選拔

營養要求性 突然變異株를 선발하기 위한 基礎合成培地를 선정하기 위하여 Vogel 最少培地(V. M. M) 및 完全培地(V. C. M)와 Fries 最少배지

(F. M. M) 및 완전배지(F. C. M)¹³, 그리고 *Endothia parasitica* 연구에 이용된 最少배지(E. P. M. M) 및 완전배지(E. P. C. M)¹⁴를 공시하였다.

1) 合成培地에서의 菌糸發育

공시최소 및 완전배지에 균을 이식, 27°C에서 72시간 배양한 후 菌叢 직경을 측정했다.

2) 供試 最少培地에서의 胞子 發芽率

각 最少배지에 고압살균한 cellophane membrane (10×10mm)을 놓고 그 위에 공시균주 柄胞子 현탁액을 도말, 96시간 후 발아율을 조사했다.

3) 單集落形成用 培地の 探索

E. P 最少배지에 菌絲 先端生長을 억제하는 L-sorbose (0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.5%)¹⁵ 및 Tween 80 (1.0%, 2.0%, 3.0%, 4.0%)을 가하고 공시균주의 병포자현탁액 (0.2~0.4×10⁴ /ml)을 0.1ml씩 分注, 全面에 도말한 후 27°C 정온기에 보존, 5일 후 단집락형성수 및 단집락의 직경을 해부현미경(×50)으로 조사했다.

3. 單集落形成用 培地에서의 柄胞子內 核의 狀態 및 發芽時間 追跡

단집락형성용 배지 (0.5% L-sorbose 첨가 E. P 最少배지)에 고압살균한 cellophane 膜을 깔고 그 위에 공시균주 S1099의 포자현탁액 (1~2×10⁵ /ml)을 白金耳로 塗抹, 27°C의 정온기에 보존, 24시간 후부터 72시간까지 12시간 간격으로 포자의 발아상태를 조사했다. 또한 일정기간별로 포자를 도말한 셀로판막을 취하여 風乾한 후 Carnoy 액에 2시간 固定, IN HCl, 60°C에서 8분간 加水分解 후 Giemsa 액 (Art, 9024, MERCK) 으로 핵을 염색¹⁶ 광학현미경(×1000)으로 핵의 상태를 조사했다.

Table 1. Details of isolates used throughout this experiment

Monoconidial isolates	Origin	Colonial color on PDA	Virulence to apple tree	Localities
Monoconidial isolates	Origin	Colonial color on PAD	Virulence to apple tree	Localities
S26	M26	Yellowish brown	+	Taegu
S513	M513	Gray	+	Taegu
S754	M754	Grayish brown	+	Talsong
S1099	M1099	Yellowish brown	++	Chongdo
SA795	M795	Black	-	Talsong

4. 紫外線 照射方法에 따른 孢子 生存率 및 Putative auxotrophs의 出現頻度

滅菌된 50ml 비이커에 각 공시균주의 병포자현탁액 ($1 \sim 5 \times 10^8/ml$)을 10ml씩 분주 하였다. 이들 비이커를 완전 暗狀態의 無菌床 위에 사용 1 시간전부터 미리 가동시켜 둔 紫外線燈(100V - 6W)에서 30cm의 거리에 두고 30초에서 130초까지 10초 간격으로 자외선을 照射하였다. 또한 균 일한 노출을 위하여 5초 간격으로 1초간씩 磁力攪拌機로 교반하면서 照射하였고 자외선 照射後 30분 이상 暗狀態에 보존한 후 병포자현탁액을 단집락형성용 배지에 0.1ml씩 분주하여 전면에도말, 27C 정온실에 3일간 배양하였다.

한편, 다른 하나의 방법으로 단집락형성용 배지에 각 공시균주의 병포자현탁액을 0.1ml씩 전면에도말한 후 현탁액에서와 동일한 방법으로 자외선을 照射하고 30분간 暗狀態에 보존한 후 27C 정온기에 3일간 배양하였다.

배양 3일 후부터 3~4일간 발아하여 어느정도 발아관 신장을 한 포자를 實體顯微鏡下에서 완전히 제거하고 그 위에 E. P 완전배지를 2ml/plate씩 重層, 27C 정온기에 24시간 이상 배양하여 형성된 단집락을 E. P 최소배지 및 완전배지에 이식하여 최소배지에서 자라지 않는 단집락 만을 선발하였다.

5. 營養要求突然變異體의 檢定

putative auxotrophs의 영양요구성을 검정하기 위하여 核酸 6종, vitamin 10종, 아미노산 20종, 총 36종의 물질을 Holliday의 방법⁸⁾에 따라 10배의 stock solution을 만들어 孔徑 0.45 μ m의 millipore filter를 통과시킨 후 4C에 보관하였다.

사용전에 室溫으로 조정하여 둔 營養素溶液을 E. P 최소배지에 이식된 putative auxotrophs의 菌絲斷片 위에 micropipette으로 0.03ml씩 滴下하여 영양요구성을 검정하였으며 對照로써 E. P 최소배지 및 완전배지를 사용하였다.

6. Auxotrophic mutants의 病原性 檢定

길이 30cm, 지름 2cm 정도의 사과나무(홍옥)切枝에 지름 5mm의 cork borer로 火傷을 입히고

그 위에 E. P 완전배지에 배양한 균종을 접종하고 27C 정온실에 보존, 24시간 간격으로 10일간 病斑長을 측정하였고 그 후 병포자형성 유무를 20일만에 걸쳐 조사하였다.

結果 및 考察

1. 基礎合成培地 選拔

1) 合成培地上에서의 菌絲發育

供試最少 및 完全培地上에서 72시간 배양한 후 각 균주의 菌叢의 직경을 측정한 결과는 Table 2와 같다.

供試菌의 계통에 따라 培地의 선택성에 차이가 있으나 전반적으로 Vogel 배지에서의 균사발육이 타의 배지에 비해 상당히 저조하였다.

최소배지의 경우 E. P 배지와 Fries 배지에서

Table 2. Growth of monoconidial strains at 3 kinds of minimal and complete media

Strains	Colony diameter (mm) ^{a)}					
	Vogel		Fries		E. parasitica	
	C.M	M.M	C.M	M.M	C.M	M.M
S26	38	8	67	34	83	31
S513	8	5	18	6	28	6
S754	39	8	75	23	82	25
S1099	24	9	65	25	75	23
SA795	28	8	54	12	61	11

^{a)} Grown at 27C for 72hrs.

균사의 발육정도가 거의 비슷하였다. 그러나 완전배지의 경우 E. P 배지에서의 균사발육이 Fries 배지에서 보다 더 양호하였다. 따라서 공시배지중 E. P 최소 및 완전배지가 본 균의 균사발육에 가장 적합한 것으로 나타났다.

2) 供試 最少培地上에서의 孢子 發芽率

공시 최소배지상에 포자현탁액을 塗抹, 90시간 후 포자의 발아율을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

供試菌의 계통에 따라 약간씩의 차이가 있으나 Vogel 배지에서의 포자 발아율이 평균 26%로 타의 배지에 비해 상당히 저조한 반면 E. P 배지 상의 포자 발아율이 평균 87%로 가장 높았다.

前項의 실험결과와 종합해 볼 때 E. P 최소배지 및 완전배지상에서 균사의 발육 및 포자 발아율이 가장 양호하였으므로 본 실험의 공시배지로 가장

Table 3. Spore germination rate at 3 kinds of minimal media

Strains	Spore germination rate(%)		
	Vogel	Fries	E. P
S26	25.8	68.8	83.2
S513	33.2	77.6	93.1
S754	27.2	83.1	90.5
S1099	23.5	78.2	89.1
SA795	22.3	72.1	81.0

적합한 것으로 판단되었다.

3) 單集落形成用 培地 的 探索

E. P 최소배지에서 L-sorbose 및 Tween-80 함량에 따른 단집락 형성수 및 단집락의 직경을 측정된 결과는 Table 4, 5와 같다.

단집락의 형성수에 있어서 供試菌株의 계통에 따라 차이가 있으나 L-sorbose 0.1% 및 Tween-80 1.0%에서 가장 많은 수의 단집락을 형성하였고 L-sorbose 1.0%와 1.5% 및 Tween-80 3%와 4%에서는 단집락 형성수가 적었다. 또한 L-sorbose에서는 농도에 따라 변이가 큰 반면 Tween-80에서는 농도가 증가하여도 비교적 소폭의 차이가 있었다.

한편, 이들 培地上에서 형성된 단집락의 직경을 보면 L-sorbose의 경우 0.1%를 제외한 모든 함량에서 비교적 小圓形의 균일한 단집락을 형성하였으나 농도가 증가할수록 단집락의 크기는 작아졌다.

Table 4. Number of single colonies formed at E.P. minimal medium containing various concentrations of L-sorbose and Tween-80

Strains	Number of single colonies formed at concentrations of ;								No. of conidia on PAD
	L-sorbose(%)				Tween-80(%)				
	0.1	0.5	1.0	1.5	1.0	2.0	3.0	4.0	
S26	0.	164	131	58	138	84	65	46	410
S513	605	220	128	72	465	416	376	268	612
S754	697	286	176	95	405	298	230	116	775
S1099	176	89	47	28	108	86	58	35	208
SA795	382	191	91	47	162	116	3.0	72	43

Table 5. Diameter of colonies formed at E.P minimal medium containing various concentrations of L-sorbose and Tween-80

Strains	Colony diameter(mm) ^{a)}							
	L-sorbose(%)				Tween-80(%)			
	0.1	0.5	1.0	1.5	1.0	2.0	3.0	4.0
S26	0.9-4.1	0.1-0.7	0.02-1.0	0.01-0.09	2.3-7.0	3.8-9.0	0.5-6.0	0.2-4.9
S513	1.3-4.5	0.3-1.1	0.09-1.0	0.08-1.0	3.0-8.0	2.0-14.0	0.7-7.0	0.4-4.8
S754	1.5-3.2	0.2-1.0	0.05-1.1	0.03-0.9	1.5-7.5	1.3-12.0	0.3-4.0	0.5-3.7
S1099	1.8-3.9	0.2-1.1	0.1-1.1	0.05-0.1	2.0-8.0	1.9-4.5	0.4-5.0	0.2-4.3
SA795	2.2-5.7	0.5-1.4	0.2-1.3	0.07-0.8	3.0-7.4	3.8-5.8	0.5-6.1	0.3-4.5

^{a)} Measured at 5 day after inoculation.

Tween-80의 경우 4.0%에서는 소원형의 균일한 단집락을 형성했으나, 그 이하의 농도에서는 L-sorbose의 경우보다 단집락이 크고 균일하지 못했다.

이상의 실험결과에서 단집락의 형성수가 비교적 많고 소원형의 균일한 단집락을 형성하는 0.5% L-sorbose가 첨가된 E. P 최소배지를 단집락 형성용 배지로 選定하였다.

L-sorbose 및 Tween-80의 함량별 단집락 형성 상태는 Plate I과 같다.

2. 單集落 形成用 培地上에서의 柄胞子內의 核의 狀態 및 發芽時間 追蹟

1) 柄胞子の 核分裂 및 發芽時間 追蹟

단집락형성용 배지상에서의 병포자내 핵의 상태 및 발아시기를 추적해 본 결과, 배양시간에 따른 발아양상은 Table 6 및 Plate II와 같다.

腐爛病菌의 成熟柄胞子는 單核이었으며 (Plate III-1), 배지상에서 병포자가 타원형으로 팽대하게 되면 1회의 핵분열이 일어나 2핵으로 되었고 (Plate III-2), 다음 단계로 발아관이 나왔으며, 이때 포자내의 핵이 발아관으로 이동 하였다 (Plate III-3), 배지상에서 포자를 도달하여 약 1% 정도가 팽대하기까지 약 24시간이 소요되었고, 72시간이 경과하여 약 43%가 발아하였다.

Table 6. Course of spore germination at the medium^{a)} for single colony formation

	Percentage of spores at each state at ;				
	24	36	48	60	72 (hrs)
Allantoid	99	74	59	57	55
Swollen	1	18	18	12	2
Germinated	0	8	23	36	43

^{a)} E.P minimal medium containing 0.5% L-sorbose

병포자는 동일 병자자내의 것일지라도 sorbose첨가 배지상에서는 발아하는 상태가 균일하지 못하였다. 또한 단집락형성용 배지상에서 발아 가능한 병포자는 45%에 불과하고 나머지 55%의 병포자는 배양 후 10일까지 未發芽 상태로 남아 있는 것으로 확인이 되었다. 그러나 PDA에 도달했을 경우는 24시간 이내에 90% 이상이 발아하였고 sorbose를 첨가하지 않은 E.P 최소배지에 있어서도 50시간 이내에 90%까지 발아하는 점으로 본다면 미발아의 원인은 sorbose의 毒性^{b)}에 의한 것으로 판단되었다.

이상의 실험결과, 포자를 배지에 도달하고 72시간이 경과하면 발아 가능한 45%의 포자중 43%가 발아하고 나머지 2%는 팽대상태로 남아 있었다. 이들 팽대상태의 포자도 시간이 더 경과하면 발아할 수 있는 것으로 추정되었다. 따라서 자외선 照射後 발아하는 野生型 병포자를 완전히 제거하기 위해서는 72시간 이상이 소요되며 그 후 완전배지를 重層하여 putative auxotrophs를 선별할 수 있을 것으로 판단되었다.

자외선의 DNA 작용기작은 DNA 위에서 pyrimidin dimer를 형성하는 것으로 되어 있는데^{15,16)} 자외선照射 직후 가시광선에 노출되면 photoreactivation에 의해 DNA의 손상부위가 收復된다^{15,17)}. 따라서 暗狀態 보존 시간은 최소한 1차 핵분열의 DNA 複製가 끝날때까지로 하는 것이 바람직하다. 포자 발아와 발아시의 핵분열 상태로 판단한다면 자외선照射後 약 60시간 暗狀態에 보존하는 것이 可視光線에 의한 mutation의 소실을 최소화하는 것으로 판단되었다.

3. 紫外線 照射方法에 따른 柄孢子 生存率 및 Putative auxotrophs의 出現頻度

putative auxotrophs의 선별을 위한 효과적인 照射방법을 선정기 위해 병포자현탁액에 자외선을 照射한 방법과 단집락형성용 배지상에 塗抹한

병포자에 자외선을 照射한 방법에서의 병포자의 생존율을 調査한 결과는 Fig. 1, 2와 같다.

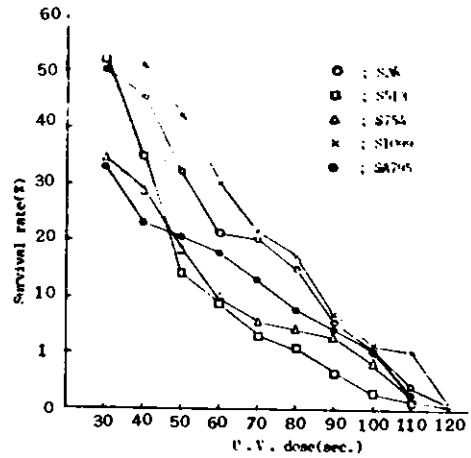


Fig. 1. Effect of ultraviolet light on the survival of conidia irradiated to conidial suspension.

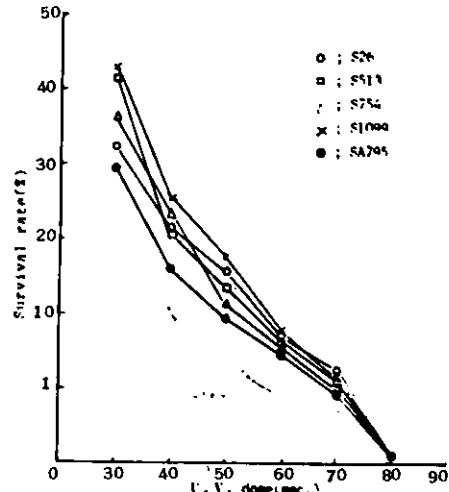


Fig. 2. Effect of ultraviolet light on the survival of conidia irradiated to conidia smeared on the medium for single colony formation.

병포자현탁액에 자외선을 照射했을 경우, 30초에서는 약 34~55%의 생존율을 나타내었으며, 130초 이상에서는 완전히 발아능력이 상실되었다.

각 供試菌株에 따라서도 병포자의 생존율에 차이가 나타났는데 30초에서 70초까지의 照射時間에서는 각 菌株間 20% 정도의 생존율의 변이를 보였고, 80초에서 110초까지는 10% 정도의 菌

株間 변이가 나타났다.

한편, 단집락형성용 배지상에 도말한 병포자에 자외선을 照射했을 경우 30초에서 29.1%~43.9%로 현탁액 照射의 경우와 비슷한 생존율을 보였으나 현탁액 照射에서 보다 훨씬 짧은 90초의 照射에서 완전히 발아능력이 상실되었다. 각 공시균주별 병포자 생존율의 차이는 30초에서 약 15% 정도의 변이를 나타내며 그 이상의 照射時間에서는 10% 미만의 차이를 보였고, 60~80초 범위에서 2% 이하의 차이가 나타났다.

이상의 두가지 자외선 照射방법을 포자생존율로 비교해 본다면 현탁액 照射方法에서 균주간의 포자생존율의 변이가 培地塗抹 照射方法에서 보다 크고 또 불규칙한 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 현탁액照射에서의 불균일 照射 때문에 생긴 것으로 생각되었으나 최초의 30초간 照射에서 菌株間에 상당한 생존율의 변이가 나타난 점으로 본다면 균주간에 자외선에 대한 耐性에 약간의 차이가 있는 것으로 생각되어졌다.

한편 자외선 照射時間이 putative auxotrophs의 유발에 미치는 영향을 조사해 본 결과는 Table 7, 8과 같다. 현탁액 조사방법에서는 80초(생존율 7%)에서 120초(생존율 0.1%)의 범위에서 putative auxotrophs를 선발할 수 있었으며 供試菌株에 따라 차이가 있으나 생존율이 0.3%에서 4% 정도인 100초에서 가장 많은 수의 putative auxotrophs를 얻은 반면, 塗抹照射方法에서는 40초(생존율 25.7%)에서 90초(생존율 0.01%)의 범위에서 putative auxotrophs를 선발할 수 있었으나 생존율이 5~6% 범위인 50초에서 가장 많은 putative auxotrophs를 얻을 수 있었다.

이상의 실험결과를 종합해 볼 때 단집락형성용 培地에 병포자를 도말하여 자외선을 照射하는 방법이 供試菌株間의 비교적 균일한 생존율과 照

Table 7. Effect of UV dose on the induction of putative auxotrophs when irradiated to conidial suspension

	60	70	80	90	100	110	120(sec)
S26	0	0	8	5	2	1	2
S513	0	1	3	2	0	2	8
S754	0	3	2	1	8	1	0
S1099	0	3	3	5	8	3	0
SA795	0	0	2	1	4	2	4

Table 8. Effect of UV dose on the induction of putative auxotrophs when irradiated the conidia which smered on the medium for single colony formation

Strains	Number of putative auxotrophs						
	UV dose 30	40	50	60	70	80	90(sec)
S26	0	0	0	8	3	2	1
S513	0	5	8	1	1	0	0
S754	0	4	3	0	1	0	0
S1099	0	2	4	1	0	0	0
SA795	0	1	2	1	0	0	0

Strains UV dose Number of putative auxotrophs

射時間에 따른 일관된 생존율, 그리고 단시간의 照射에서도 putative auxotrophs를 얻을 수 있는 것으로 판단되었다.

4. 營養要求突然變異體的 檢索

E.P 완전배지 및 최소배지상에서 繼代培養을 통하여 안정화시킨 161株의 putative auxotrophs 중 10株의 영양요구성이 확인되었는데 그 결과는 Table 9와 같다.

공시균주별로 보면 S26에서 cytosine 요구성, cysteine 요구성, folic acid 요구성이 각 1균주씩 확인이 되었고, S754에서 adenine, hypoxanthine, aspartic acid 및 thiamine 요구성 각 1균주씩 S1099에서 adenine 요구성 1균주, SA795에서 methionine 요구성 1균주 등이 확인되었다.

Table 9. List of auxotrophic mutants obtained

Isolates designation	Origin	Nutrient requirement
AM26-1	S26	Folic acid
AM26-2	S26	Cysteine
AM26-3	S26	Cytosine
AM513	S513	Nicotinic acid
AM754-1	S754	Adenine
AM754-2	S754	Aspartic acid
AM54-3	S574	Hypoxanthine
AM754-4	S754	Thiamine
AM1099	S1099	Adenine
AM795	S795	Methionine

5. Auxotrophic mutants의 病原性 檢定

영양요구성이 확인된 10개의 돌연변이주의 병원성을 검정해 본 결과, 비병원성 5균주, 약병원성 2균주, 그리고 강병원성 3균주로 나타났다(Table 10).

약병원성 및 강병원성 菌株에 의해 形成된 병반

Table 10. Pathogenicity and conidial formation of the auxotrophs

Mutant strains	Lesion length(mm)	Conidial formation
AM26-1	0	—
AM26-2	15	—
AM26-3	98	—
AM513	112	+
AM754-1	21	—
AM754-2	0	—
AM754-3	0	—
AM754-4	0	—
AM1099	27	—
AM795	0	—

에서의 병자각 형성 유무를 조사해 본 결과, AM 513 (Nic⁻) 이 병포자를 형성하였고 나머지 돌연변이주는 전혀 병자각을 형성치 못하였다.

일반적으로 野生型 공시균주는 접종 후 10일경이면 병자각을 형성하고 경우에 따라서는 胞子塊를 누출시키는 데에 반해 영양요구성 돌연변이주는 병원성을 유지하고 있으면서도 병반상에서 병포자를 형성치 못한다는 사실은 돌연변이에 의한 생리적 장애 때문인 것으로 생각되어지는데 영양요구성 돌연변이주의 병원성 상실 또는 胞子形成能 상실 등에 관해서는 보다 정밀한 연구가 필요하다.

摘 要

사과나무 부란병균 병반상에서 검출된 비병원성 *Valsa* 속 균의 비병원균 인자가 부란병균으로 전이되는지의 여부를 밝히기 위해서는 적당한 遺傳標識이 필요하므로 두 菌種에서 영양요구성 돌연변이주를 作出하기 위해 수행한 실험결과는 다음과 같이 요약된다.

본 균의 영양요구성 돌연변이주의 검출에 가장 적합한 합성배지로는 *E. Parasitica*의 연구에 사용되었던 최소배지 및 완전배지가 선발되었고 단집락형성용 배지로는 이 최소배지에 0.5%의 L-sorbose를 첨가한 것이 가장 좋았다.

단집락형성용 배지상에서 포자가 발아하기까지는 약 96시간이 소요되는 것으로 밝혀져 자외선 조사후 완전배지를 重層, putative auxotrophs를 선발하기 위해서는 적어도 96시간 이상 野生型을 지속적으로 제거해야 될 것으로 나타났다. 병포자 발아과정의 핵의 행동을 추적해 본 결과, 1차 핵분열이 일어나는데 소요되는 시간은 약 60시간으로 자외선 처리 후 photoreactivation에 의한 reversion을 최소화하기 위해서는 照射後 60時間 이상 暗狀態에 보존해야 하는 것으로 나타났다. 적절한 자외선 照射方法을 선정하기 위하여 병포자현탁액에 照射하는 방법과 단집락형성용 배지에 포자를 도말하고 그 위에 자외선을 照射하는 방법을 비교 검토해 보았다. 병포자현탁액에 자외선을 照射한 방법에서는 130초에서 포자의 발아능력이 완전히 상실되었고 생존율이 0.1%에서 7%의 범위인 80초~120초 사이에서 putative auxotrophs를 선발할 수 있었다. 한편, 단집락형성용 배지상에 도말된 병포자에 자외선을 照射한 방법에서는 90초의 照射에서 포자의 발아능력이 완전히 상실되었고 50초 정도의 照射에서 가장 많은 수의 putative auxotrophs를 선발할 수 있었으며, 照射시간에 따른 포자생존율에 있어서 균주간에 큰 변이가 없는 후자의 방법이 우수한 것으로 나타났다.

본 실험에서 선발한 161개의 putative auxotrophs 중 10개의 영양요구성이 확인이 되었는데 nucleic acid base 요구성 4균주, amino acid 요구성 4균주, vitamine 요구성 2균주가 얻어졌다. 이들 영양요구성 돌연변이주의 병원성을 조사한 결과, 병원성이 상실된 것이 5균주, 약병원성 3균주, 여전히 강한 병원성을 유지하고 있는 것이 2균주로 나타났는데 약병원성 또는 강병원성을 나타낸 5균주중 nicotine 요구성인 AM513만 병반상에서 포자가 내장된 병자각을 형성하였고 여타의 균주는 胞子形成能 상실되었다.

引用 文 獻

1. Anagnostakis, S. L. and Waggoner, P. E. : 1981, Hypovirulence, vegetative incompatibility, and the growth of cankers of chestnut blight, *Phytopathology*, 71 : 1198-1202.
2. Anagnostakis, S. L. : 1982, Biological

- control of chestnut blight, *Science*, 215 : 466-471.
3. Brockman, H. E. and De Serres, F. J. : 1963, Sorbose toxicity in *Neurospora*, *Am. J. of Botany*, 50 : 709-714.
 4. Dodds, J. A. : 1980, Association of type 1 virus like dsRNA with club-shaped particles in hypovirulent strains of *Endothia parasitica*, *Virology*, 107 : 1-12.
 5. Elliston, J. E., Janynes, R. A., Day, P. R. and Anagnostakis, S. L. : 1977, A native american hypovirulent strain of *Endothia parasitica*, *Proc. Am. Phytopathology, Soc.*, 4 : 83.
 6. Holliday, R. : 1956. A new method for the identification of biochemical mutants of micro-organisms, *Nature*, No 4540 : 987.
 7. 石川辰天 ; 微生物遺傳學實驗法, 1st ed., 共立出版株式會社, 東京 (1982) PP. 219 ~ 220.
 8. Janes, R. A. and Elliston, J. E. : 1980, Pathogenicity and canker control by mixture of hypovirulent strains of *Endothia parasitica*, chestnut blight, *Phytopathology*, 70 : 453-456.
 9. Puhalla, J. E. and Anagnostakis, S. L. : 1970, Genetics and nutritional requirements of *Endothia parasitica*, *Phytopathology*, 61 : 169.
 10. Setlow, R. B., Swenson, P. A. and Carrier, W. C. : 1963, Thymine dimers and inhibition of DNA synthesis by UV irradiation of cells, *Science*, 142 : 1464 - 1466.
 11. Setlow, R. B., Carrier, W. C. and Bollum, F. J. : 1965, Pyrimidine dimers in UV-Irradiated poly dI : dC, *Proc. Natl. Acad. Sci. in U. S. A.*, 53 : 1111-1118.
 12. 新聞宏夫 : 1959. 植物病原菌の核の簡單存染色法, 農業及園藝, 第34卷 第5號, 837 ~ 838.
 13. Stanier, R. Y. : *The microbial world*, 4th ed., Perntice-Hall, Inc, Englewood Cliffs, New Jersey (1976) pp. 411-413.
 14. Van Alfen, N. K. : 1982, Biology and potential disease control of hypovirulence of *Endothia parasitica*, *Ann. Rev. Phytopathology*, 20 : 349-362.
 15. Van Alfen, N. K., Janes, R. A., Day, P. R. and Anagnostakis, S. L. : 1975, Chestnut blight ; Biological control by transmissible hypovirulence in *Endothia parasitica*, *Science*, 189 : 890-891.
 16. Witkin, E. M. : 1966, Radiation - induced mutations and their repair, *Science*, 152 ; 1345-1353.
 17. Yamamoto Kazuo : 1985, Photoreactivation reverse ultraviolet radiation induced premutagenic lesions to leading to frameshift mutations in *E. coli* *Mol. Gen. Gent.*, 201 : 141-145.