

## 사과 탄저병균 *Glomerella cingulata*에 의한 감염과 Cutinase의 활성에 미치는 유기인계 살균제의 효과

김기홍\* · 이창은<sup>1</sup>

과수연구소, <sup>1</sup>영남대학교 농축산대학 원예학과

## Effects of Organophosphorus Fungicides on Cutinase Activity and Infection of Apple by *Glomerella cingulata*

Kee Hong Kim\* and Chang Un Lee<sup>1</sup>

Fruit Tree Research Institute, Suwon 440-310, Korea

<sup>1</sup>Department of Horticulture, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

**ABSTRACT :** Effects of organophosphorus fungicides on cutinase activity from *Glomerella cingulata* causing apple anthracnose and infection of apple were investigated. Diisopropylfluorophosphate (DFP) inhibited the enzyme activity indicating that catalysis involves an active serine. In inhibition of the enzyme activity by organophosphorus fungicides,  $I_{50}$  (molar concentration of fungicide at which the enzyme activity is inhibited 50%) of Hinosan and Kitazin P were 26.3  $\mu$ M and 427.7  $\mu$ M, respectively. At concentration of  $10^{-3}$  M DFP and organophosphorus fungicides, the infection of *G. cingulata* was inhibited to 5% in comparison with 15% infection at the unwounded healthy control, but increased to 30% when added with 1 mg/ml of cutinase. Mycelial growth was 36 mm in colony diameter on the medium added with  $10^{-4}$  M of hinosan in comparison with 90 mm of the untreated control, but was 90 mm on the medium added with  $10^{-4}$  M of kitazin P showing lower inhibition than hinosan. The spore germination was more than 60% at all the concentrations of both fungicides.

**Key words :** *Glomerella cingulata*, Diisopropylfluorophosphate (DFP) organophosphorus fungicides,  $I_{50}$ , hinosan, kitazin P.

각피층은 대부분의 식물체표면을 덮고 있어 식물을 보호하는 것으로 그 주성분은 cutin이며 여기에 wax, cellulose 및 pectin 등으로 구성되어 있다. 이러한 각피층의 구조는 식물체의 종류에 따른 유전적인 요인(9, 17) 뿐만 아니라, 기후와 습도 및 다른 환경적인 요인에도 영향을 받는다(12, 13). 1970년대 들어와서 전자현미경에 의한 조직화학적 연구(14, 15)는 병원균이 기주를 침입하는데 효소가 관여하는 증거를 제시하였고 균의 침입 부위에 cutin의 화학적 변화뿐만 아니라 esterase활성이 있음이 구명되었다(8, 16). 1978년에 Lin과 Kolattukudy(10)은 glucose가 cutinase생산을 억제하며 포자가 발아할 때 생산된 cutinase에 의해 각피층이 분해되고 그 분해산물인 cutin monomer는 cutinase생산을 촉진하여 더 많은

양의 cutinase를 생산하게 할 것이라고 하였으며, diisopropylfluorophosphate(DFP)를 처리하였을 때 효소활성이 감소하는 것으로 보아 serine hydrolase일 것이라고 하였다(18). 1982년에 Köller 등(5)은 몇 가지 유기인계 농약에 의해 *Fusarium solani* f. sp. *pisi*가 cutin배지에 배양되어 생산한 cutinase를 불활성화시켰고 동 병원균에 의한 *Pisum sativum*의 병발생을 억제시킬 수 있었다고 하였다. 1983년에 Dickman 등(1)도 비슷한 실험으로 papaya탄저병균인 *Colletotrichum gloeosporioides*에 의해 생산된 cutinase를 불활성화시켰으며, papaya의 탄저병 발생이 억제되었다고 하였다.

따라서 본 실험은 사과 탄저병균 *Glomerella cingulata*에 의해 생산된 cutinase의 활성 억제와 감염에 미치는 유기인계 살균제의 효과에 대하여 조사하였다.

\*Corresponding author.

## 재료 및 방법

**공시 병원균.** 본 실험에서 사용한 병원균은 자연 상태에서 감염된 사과외 이병과에서 순수분리한 *Glomerella cingulata*를 사용하였다.

**Cutinase의 활성측정.** Cutinase의 활성은 Kolatukudy 등(4)의 방법에 따라 측정하였고, cutinase정제는 전보에 보고(3)한 방법으로 하였다.

**Active site.** Cutinase의 작용기를 알아보기 위하여 esterase억제제로 알려진 diisopropylfluorophosphate(DFP)에 대한 효소활성의 억제도를 측정하였다(6). DFP 용액( $2 \times 10^{-9} \sim 2 \times 10^{-2}$  M) 0.5 ml와 효소액(5 µg/ml) 0.5 ml를 혼합하여 25°C에서 20분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하여 그 억제도를 조사하였다(5).

**유기인계 살균제에 의한 cutinase의 활성억제.** Cutinase의 억제제인 DFP와 화학구조식이 비슷한 유기인계 살균제 중 현재 시판되고 있는 hinosan과 kitazin P를 공시하여 효소활성의 억제도를 측정하였다. 억제도는 효소활성을 50% 감소시키는데 필요한 살균제의 molar농도( $I_{50}$ )로 표시하였다(1, 5). 정제된 cutinase(5 µg/ml)를 0.5% Triton X-100이 함유된 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.5)에 용해하여 최종반응 혼합액이 1 ml가 되게 살균제용액을 가한 후 25°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 살균제 용액은 살균제를 acetone에 용해한 후 증류수를 첨가하여 필요한 농도로 조제하였고 이때 사용된 살균제는 증량제나 보조제가 들어 있지 않은 원제를 사용하였다.

**DFP와 유기인계 살균제에 의한 감염억제.** 후지 품종 사과를 sodium hypochlorite 용액(0.5%)에 10분간 침지하여 표면살균한 후 살균증류수로 수세하였다. 접종을 하기 위해 내경 0.5 cm, 길이 0.5 cm인 tygon tube를 살균된 사과 표면에 paraffin으로 부착시킨 후 포자현탁액( $10^7$  spores/ml)과 DFP, 유기인계 살균제 및 cutinase(1 mg/ml)를 각각 혼합하여 25 µl씩 접종한 후 27°C에서 7일간 배양하여 발병률을 조사하였다. 접종은 각 처리 당 5개의 과실로 하였고, 과실 당 20곳에 접종하였다. 상처접종은 바늘상처를 낸 후 접종하였으며, 대조구는 포자현탁액만을 접종한 것으로 하였다.

**유기인계 살균제에 의한 균사생장 및 포자발아 억제.** 유기인계 살균제에 대한 균사생장 측정은 살균제를 PSA배지에 여러 농도로 혼합하여 공시균주의 균사절편을 접종한 후 27°C에서 7일간 배양하여 균총직경을 측정하였다. 포자발아율은 전기한 살균제배지에 공시균주의 포자현탁액( $10^6$  spores/ml)을

접제한 후 27°C에서 16시간 배양하는 동안에 측정하였다. 대조구는 살균제 무첨가구로 하였다.

## 결과 및 고찰

**Active site.** Esterase는 활성기에 serine이 관계되어 있다고 알려져 있고(7) serine에 작용하여 효소를 불활성화시키는 diisopropylfluorophosphate(DFP)에 의한 효소활성 억제를 측정한 결과(Fig. 1), DFP의 효소활성 억제가 직선적으로 증가하여  $10^{-3}$  M에서는 효소활성이 90% 이상 억제되었다. 이것은 Purdy 등(18)의 결과와 상응한 것으로 본 cutinase 역시 작용기가 serine인 hydrolase임을 알 수 있었다.

**유기인계 살균제에 의한 cutinase의 활성억제.** 유기인계 살균제에 의한 cutinase의 활성억제는 살균제 용액과 효소액을 혼합하여 25°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 효소활성을 측정한 결과(Table 1), 효소활성을 50% 감소시키는데 kitazin P는 427.7 µM이었다. 이러한 실험 결과는 Köller 등(5)과 Dickman 등(1)의 결과와 상응하는 것으로 cutinase의 serine 잔기가 phosphorylation에 의해 불활성화(2, 6)되는 것으로 생각된다.

**DFP와 유기인계 살균제에 의한 감염억제.** DFP와 유기인계 살균제를 접종원에 혼합하여 사과에 접종한 후 27°C에서 7일간 배양하여 발병률을 조사한 결과(Table 2), DFP의  $10^{-5}$  M 처리구에서는 발병률

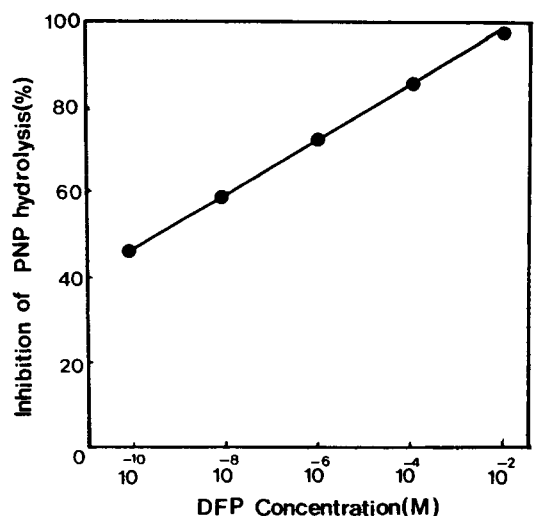


Fig. 1. Inhibition of *Glomerella cingulata* cutinase activity with increasing concentrations of diisopropylfluorophosphate (DFP) on p-nitrophenyl palmitate (PNP) hydrolysis.

**Table 1.** Cutinase inhibition by organophosphorus fungicides

Fungicide	Chemical structure	I <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)
Hinosan	$(\text{C}_6\text{H}_5-\text{S})_2\text{P}=\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5$	26.3
Kitazin P	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{S}-\text{P}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$	427.7

<sup>a</sup>I<sub>50</sub> is the molar concentration of fungicides required to caused 50% inhibition of the enzyme activity after 1hr incubation at 25°C.

**Table 2.** Effect of cutinase, wounding, hinosan, kitazin P and diisopropylfluorophosphate (DFP) on the infection of apple fruits by *Glomerella cingulata*<sup>a</sup>

Treatment	Concentration	Infection (%) <sup>b</sup>
Control	—	15
Cutinase	—	30
Wound	—	98
Hinosan	10 <sup>-5</sup> M	15
	10 <sup>-4</sup> M	13
	10 <sup>-3</sup> M	5
Kitazin P	10 <sup>-5</sup> M	13
	10 <sup>-4</sup> M	8
	10 <sup>-3</sup> M	5
DFP	10 <sup>-6</sup> M	15
	10 <sup>-5</sup> M	10
	10 <sup>-4</sup> M	5

<sup>a</sup>Inoculated fruits were incubated for 7 days at 27°C.

<sup>b</sup>Mean of three replicates. Each replicate consists of five fruits with twenty inoculation sites.

이 15%로 대조구와 비슷하였으나, 10<sup>-3</sup> M에서는 5%로 낮았으며, hinosan과 kitazin P도 비슷한 경향으로 10<sup>-3</sup> M에서 5%의 발병률을 보여 이들 화합물에 의한 병발생 억제 가능성에 보였다. 또한 점종원에 cutinase(1 mg/ml)를 혼합하여 접종하였을 때에는 30%의 발병률을 보였으나, 대조구인 무상처접종은 15%였으며 상처접종은 98%에 달하였다. 이러한 실험 결과는 Küller 등(5)과 Dickman 등(1)이 보고한 결과와 비슷하나, 본 실험에서는 무처리구인 대조구에서 발병률이 15%로 공시균주인 *G. cingulata*는 사과와 각피층을 직접 관입할수 있을 것으로 생각된다.

유기인계 살균제에 의한 균사생장과 포자발아 억제. 균사생장 측정은 공시 살균제를 혼합시킨 PSA배지에 공시균주의 함균한천을 접종하여 균총

**Table 3.** Mycelial growth and spore germination of *Glomerella cingulata* on PSA added with organophosphorus fungicides

Fungicide	Concentration	Colony diameter (mm) <sup>a</sup>	Germination (%) <sup>b</sup>
Control	—	90	100
Hinosan	10 <sup>-5</sup> M	90	95
	10 <sup>-4</sup> M	36	84
	10 <sup>-3</sup> M	18	60
Kitazin P	10 <sup>-5</sup> M	90	98
	10 <sup>-4</sup> M	90	95
	10 <sup>-3</sup> M	45	85

<sup>a</sup>Colony diameter observed after incubation for 7days at 27°C

<sup>b</sup>Percentage of germinated conidia obtained during the period of 16 hr after incubation at 27°C.

직경을 측정한 결과(Table 3), hinosan의 10<sup>-5</sup> M에서는 대조구의 균총직경과 같은 90 mm로 균사생장이 억제되지 않았으나, 10<sup>-4</sup> M에서는 36 mm였으며 10<sup>-3</sup> M에서는 18 mm로 균사생장이 억제되었다. kitazin P는 10<sup>-5</sup> M과 10<sup>-4</sup> M에서 모두 90 mm였으며 10<sup>-3</sup> M에서는 45 mm로 hinosan에 비하여 균사생장 억제력이 낮았다. 포자발아율의 측정은 전기한 살균제 배지에 공시균주의 포자현탁액을 점적한 후 포자발아율을 측정한 결과(Table 3), 사용된 모든 농도에서 60% 이상의 발아율을 보여 포자발아 억제력이 낮았다. 이러한 실험결과(Table 1~3)는 유기인계 살균제에 의한 병발생의 억제가 포자발아의 억제에 의한 것이 아니라, 기주를 침입할 때 병원균이 생산하는 cutinase의 불활성화에 의한 것으로 생각된다(2). 이러한 cutinase의 불활성화는 DFP처리에 의한 불활성화와 같은 기작으로 유기인계 살균제의 인(P) 성분이 cutinase의 serine잔기와 결합하여 cutinase를 불활성화시키는 것으로 생각된다(6). 따라서 유기인계 살균제에 의해 병원균이 생산한 cutinase가 불활성화됨으로서 기주인 사과 각피층의 분해가 억제되어 병원균이 기주내로 침입하지 못함으로 발병률이 감소되었을 것이다. 또한 점종원에 정제된 cutinase를 첨가함으로써 각피층이 분해되어 병원균이 용이하게 기주 내로 침입할수 있어 발병률이 증가되었을 것이다. Köller 등(5)과 Maiti 등(11)은 유기인계 농약의 처리로 *Fusarium solani* f. sp. *pisi*에 의한 *Pisum sativum*의 감염이 억제되었다고 하였으며, Dickman 등(1)은 *Colletotrichum gleosporioides*에 의한 papaya탄저병 발생이 억제되었다고 한 것도 이러한 기작에 의한

것으로 생각되나 앞으로 진전된 실험을 통하여 상세한 작용기작에 대해 세밀한 시험이 요청된다.

## 요 약

사과 탄저병원균 *Glomerella cingulata*에 의하여 생산된 cutinase의 활성과 감염에 미치는 유기인계 살균제의 영향을 조사하였다. Diisopropylfluorophosphate(DFP)에 의해 효소활성이 억제되어 이 효소의 작용기가 serine임을 알수 있었다. 유기인계 살균제에 의한 cutinase의 활성억제에서 효소활성을 50% 감소시키는데 필요한 살균제의 양인  $I_{50}$ 은 hinosan이 26.3  $\mu\text{M}$ 이었고, kitazin P는 427.7  $\mu\text{M}$ 이었다. DFP와 유기인계 살균제에 의한 공시균주의 발병률 조사에서 대조구인 무상처접종구의 발병률이 15%이었으나 DFP와 유기인계 살균제의  $10^{-3}$  M 처리구에서는 5%로 억제되었으며, cutinase 첨가구(1 mg/ml)는 30%로 증가되었다. 균사생장 억제 조사에서 무처리의 균총직경 90 mm와 비교하여 hinosan을  $10^{-4}$  M로 첨가한 배지에서 균총직경이 36 mm였으나 kitazin P는 같은 농도에서 90 mm로 hinosan에 비하여 억제력이 낮았다. 또한 포자발아율은 실험에 사용된 모든 농도에서 60% 이상을 나타내어 포자발아 억제력이 낮았다.

## 참고문헌

- Dickman, M. B., Patil, S. S. and Kolattukudy, P. E. 1983. Effect of organophosphorus pesticides on cutinase activity and infection of papaya by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology* 72: 1209-1214.
- Eto, M. 1974. Organophosphorus Pesticides. pp. 123-231 In: *Organic and Biological Chemistry*. Chemical Rubber Company Press. Inc., Cleveland, OH.
- 김기홍, 이창은. 1992. 사과 탄저병균 *Glomerella cingulata*에 의한 cutinase의 생산과 정제. *한식병지*, 7(4): 236-240.
- Kolattukudy, P. E., Purdy, R. E. and Maiti, I. B. 1981. Cutinase from fungi and pollen. *Methods in Enzymology* 71: 652-664.
- Köller, W., Allan, C. R. and Kolattukudy, P. E. 1982. Inhibition of cutinase and prevention of fungal infection of plant by organophosphorus pesticides. *Phytopathology* 72: 1425-1430.
- Köller, W. and Kolattukudy, P. E. 1982. Mechanism of action of cutinase: Chemical modification of the catalytic triad characteristic of serine hydrolases. *Biochemistry* 21: 3083-3090.
- Krisch, K. 1971. *The Enzymes* (Boyer, T., ed), Vol. 5, Academic Press, New York, 43p.
- Kunoh, H. and Akai, S. 1969. Histochemical observation of the halo on the epidermal cell wall of barley leaves attacked by *Erysiphe graminis hordei*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 37: 113-118.
- Linskens, H. F. 1952. über die Änderung der Benetzbarkeit von Blattoberflächen und Ursache. *Planta* 41: 40-51.
- Lin, T. S. and Kolattukudy, P. E. 1978. Induction of a biopolyester hydrolase (cutinase) by low levels of cutin monomers in *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *J. of Bacteriol.* 133: 942-951.
- Maiti, I. and Kolattukudy, P. E. 1979. Prevention of fungal infection of plants by specific inhibition of cutinase. *Science* 205: 507-508.
- Martin, J. T. 1964. Role of cuticle in the defense against plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2: 81-100.
- Mazliak, P. 1968. Chemistry of plant cuticle. In: *Progress in Phytochemistry*, ed. by Reinhold, L., Liw-schitz, Y. I.: 49-111. London/New York/Sydney, Wiley-Interscience.
- McKeen, W. E. 1974. Mode of penetration of epidermal cell walls of *Vicia* by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 64: 461-467.
- Murray, G. M. and Maxwell, D. P. 1975. Penetration of *Zea mays* by *Helminthosporium carbonum*. *Can. J. Bot.* 53: 2872-2883.
- Nicholson, R. L., Kuc, J. and Williams, E. B. 1972. Histochemical demonstration of transitory esterase activity in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 62: 1242-1247.
- Preece, T. F. and Dickinson, C. H. 1971. *Ecology of Leaf Surface Microorganism*, especially Sect. I: 1-4; II: 4-5; III: 5-7, 13-14; V: 1-10. London/New York, Academic Press.
- Purdy, R. E. and Kolattukudy, P. E. 1973. Depolymerization of a hydroxy fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from *Fusarium solani* f. sp. *pisi*: Isolation and some properties of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 159: 61-69.