

논피잎마름병균(*Exserohilum monoceras*)의 독소생산과 그 기주반응

조재민* · 홍연규 · 엄재열¹
농촌진흥청 영남농업시험장, ¹경북대학교 농생물학과

Production of a Phytotoxic Substance by *Exserohilum monoceras*, the Causal Fungus of Barnyardgrass Leaf Blight, and its Response on Host Plants

Jae Min Cho*, Yeon Kyu Hong and Jae Youl Uhm¹

National Yeongnam Agricultural Experiment Station, RDA, Milyang 627-130, Korea

¹Department of Agricultural Biology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

ABSTRACT: Phytotoxicity of the culture filtrate and culture conditions for the production of the phytotoxin by *Exserohilum monoceras* 92-044 were examined. The necrotic lesions were developed on the leaves of *Echinochloa crus-galli* within 48 hrs after inoculation of the culture filtrate, and the leaves were completely blighted within 5-7 days. Maximum toxicity was found in the culture broth containing 20% V-8 juice. Phytotoxin accumulation and fungal growth reached their highest peak at around 11 days. Typical symptom appeared on the leaf of *E. crus-galli* within 48 hrs. Only a weak chlorosis appeared on rice, *Arundinella hirta* (THUNB) and henry crabgrass (*Digitaria sanguinalis* SCOP.), but no further symptom developed.

Key words: *Exserohilum monoceras*, phytotoxicity, host response

논피, 강피 등의 피 종류는 수도재배기간 중의 우생 초종으로 논 잡초 중에서도 가장 심각한 문제를 야기시키는 중요한 잡초이며 쌀의 수량과 품질을 떨어뜨리는 원인이 되고 있다(11, 17).

잡초방제를 위해서는 경종적 방제, 손제초, 기계적 방제, 제초제 등이 사용되고 있으며, 최근 노동력 부족과 인건비 등의 상승으로 인하여 주로 유기합성 제초제에 의존하고 있는 실정이다(3, 11). 그러나, 제초제 남용으로 인해 저항성 잡초가 출현하게 되고 환경오염에 대한 사회적 관심이 점차 늘어나면서(21), 잡초에 기생하는 병원균을 이용한 생물적 방제가 시도되고 있다(10, 12, 21). 피의 생물적 방제를 위한 병원균으로 우리나라에서 1990년 정 등(3)이 피의 잎마름 증상을 일으키는 *Exserohilum monoceras* (Drechsler) Leonard & Suggs를 분리, 동정하였고, 이어서 일본과 필리핀에서도 *Drechslera monoceras* (Drechsler) Subram. & Jain과 *Exserohilum monoceras*가 최근 보고되었다(9, 10, 22).

그리고 잡초병원균이 분비하는 독소물질을 이용한

새로운 제초제의 개발이 시도되어 왔는데, 이 방법은 잡초에 대해 선택성이 뛰어나고, 유기합성농약에 비해 환경오염이 적으며 개발비용이 적다는 장점 때문에 많은 연구가 진행되고 있다(4, 6, 14). *E. monoceras*는 Monocerin이라는 독소를 생성하며, 이는 보리 환가루병균에 항균활성을 나타내며, Johnsongrass(*Sorghum halepense*(L.) Pers.)와 Canada thistle(*Cirsium arvense*(L.) Scop.)에 독소활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(1, 19).

본 연구에서는 *E. monoceras*의 피에 대한 독소활성을 확인하고, 독소를 생산하기 위한 일반적 배양조건을 확립하며, 벼를 포함한 다른 기주식물체에 대한 독소반응을 검정했다.

재료 및 방법

공시균주 및 배양여액의 조제. 논피 잎마름병균, *Exserohilum monoceras* 92-044 균주를 IRRI (International Rice Research Institute, Manila, Philippines)의 Biological weed control lab., Dr. A. K. Watson으로부터 분양받아 PDA(potato dextrose agar)

*Corresponding author.

사면에 이식하여 4°C에 보존하면서 실험에 사용하였다. 배양여액의 조제는 20% V-8 juice 배지를 50 ml씩 250 ml 삼각 플라스크에 분주, 121°C에서 15분간 멸균한 다음, PDA 평판배지에서 7일간 배양된 *E. monoceras* 92-044균주의 균사 선단부로부터 절취한 6 mm agar disc 3개씩을 이식, 28°C에서 15일간 150 rpm으로 진탕배양하였다. 이 균배양액을 cheesecloth, filter paper(Whatman No. 1) 및 Millipore membrane(0.45 µm)에 순차 여과하여 cell-free 배양여액을 조제하였다.

생물검정. 직경 9 cm Petri dish에 충분히 젖은 filter paper를 깔고 그 위에 영남농업시험장 수도포장에서 수집된 물피와 강피의 종자를 뿌린 후, 28°C에서 48시간 동안 최아시켜 발아한 종자를 1/5000a Wagnor pot에 5본씩 이식, 밤낮의 온도가 25/35±5°C인 온실에서 20~30일 생육시켜 생물검정에 사용하였다. Cell-free 배양여액을 45°C에서 1/20로 감압농축한 다음, Tween 20을 0.05%(V/V) 되도록 첨가, 이를피의 잎 전면에 20 µl씩 점적한 후 시간의 경과에 따른 엽조직의 변화를 육안관찰하였으며, 대조는 균을 접종하지 않은 배지를 같은 농도로 농축하고 Tween 20을 첨가하여 사용하였다. 독소생성정도는 1/20로 농축한 배양여액을 2배씩 최고 1024배까지 희석하여 각각 점종하였을 때 피사 또는 황화증상을 일으키는 최종희석배수(dilution endpoint)를 측정, 비교하였다(8)

독소생산을 위한 배양조건 조사. 독소생성에 효과적인 배지를 선별하기 위해서 5종류의 배지를 사용하였다; Czapek Dox broth(CDB, Sigma C1551), potato dextrose broth(PDB, Difco), 20% V-8 juice(Campbell Soup Company, U.S.A.), modified Fries liquid medium (MFLM: sucrose 30.0 g, ammonium tartrate 5.0 g, NH₄NO₃ 1.0 g, KH₂PO₄ 1.0 g, MgSO₄ 0.5 g, NaCl 0.1 g, CaCl₂ 0.1 g, casein hydrolysate 0.5 g, yeast extract 1.0 g in 1,000 ml distilled water) (18, 22), *Echinochloa extracts* medium(온실에서 20일 이상 생육한 강피줄기 200 g을 1 l의 증류수에 넣고 마쇄기(10⁴ rpm)로 20분간 마쇄한 후, 5점의 cheesecloth와 filter paper(Whatman No.1)에 거른 여액). 각각의 배지에 *E. monoceras* 92-044 균주를 이식, 28°C에서 15일간 진탕 배양한 다음 균생장량과 독소생성정도를 비교하였다.

균생장량을 조사하기 위해서 균사체를 Büchner funnel에 올린 filter paper(Whatman No. 1)로 감압여과한 후, 증류수로 2~3회 세척, 건조한 후 무게를 측정하였다(2).

진탕배양과 정치배양간의 독소생산성을 비교하기 위해서, *E. monoceras* 92-044균주를 20% V-8 juice배

지에 이식, 28°C 암상태에서 진탕(150 rpm) 및 정치배양하면서 각각 3, 6, 9, 12, 15일 후에 각각의 균생장량과 독소생성정도를 측정하였다. 독소생성에 미치는 배지의 pH효과를 알아보기 위해서, 1 N NaOH와 1 N HCl로 20% V-8 juice배지의 pH를 3.0, 5.0, 6.5, 7.5, 9.0으로 조정된 다음, *E. monoceras* 92-044균주를 이식, 28°C에서 12일간 진탕배양하여 독소생성정도를 비교하였다. 배양기간에 따른 독소생성정도를 알기 위해서 *E. monoceras* 92-044균주를 20% V-8 juice 액체배지에 접종, 암상태에서 진탕배양(150 rpm, 28°C)하면서, 각각 2, 3, 5, 6, 9, 11, 15일 후에 균생장량과 독소생성능력을 측정하였다.

독소의 기주범위 조사. 동진벼를 포함한 10개 품종의 벼와 보리, 밀의 종자를 28°C에서 48시간 동안 최아시켜 1/5000 Wagnor pot에 이식한 후, 밤낮의 온도가 25/35±5°C인 온실에서 20일 이상 생육시켜 생물검정에 사용하였다. 기타 작물과 잡초는 영남농업시험장 온실에서 재배, 관리되고 있는 것을 사용하여, 1/20로 농축한 배양여액을 각 기주의 잎에 점적한 후 독소에 대한 반응을 조사했다.

결 과

배양여액의 독소활성. *E. monoceras* 92-044 균주의 농축한 배양여액을 3~4엽기의 물피와 강피의 잎에 점적처리한 결과 약 48시간 후 점적부위의 조직이 연화되면서 일부는 검게 피사되고 그 주변부가 황화되었으며, 접종 5~7일 후에는 피사부위로부터 상부의 잎 전체가 고사하였다. 그러나, 대조로 사용한 배지에서는 이러한 증상이 관찰되지 않았다(Fig. 1).

독소의 생산. *E. monoceras* 92-044 균주를 각기 다른 5종류의 배지에 배양, 배양여액의 피에 대한 독소활성을 비교한 결과, 5개 배지의 배양여액 모두 독소활성이 검출되었으며, 그 중 V-8 juice 배지에서 농축한 배양여액의 128배 희석까지 독소활성이 있었고, PDB에서는 2배 희석까지만 나타나 독소활성이 가장 낮았다. 균생장량은 20% 피의 추출물로 만든 배지(ECH)에서 100 mg으로 가장 적었고, 다음으로 V-8 juice CDB, PDB배지순이었으며, modified Fries liquid medium(MFLM)에서는 590 mg으로 균 생장량이 가장 많았다(Table 1).

진탕배양과 정치배양에서 균생장량과 독소활성을 비교한 결과, 배양초기의 균생장은 진탕배양에서 다소 빨랐으나 6일 이후로는 차이가 없었으며, 독소활성에 있어서도 이와 비슷한 경향을 보여 독소생성에 미

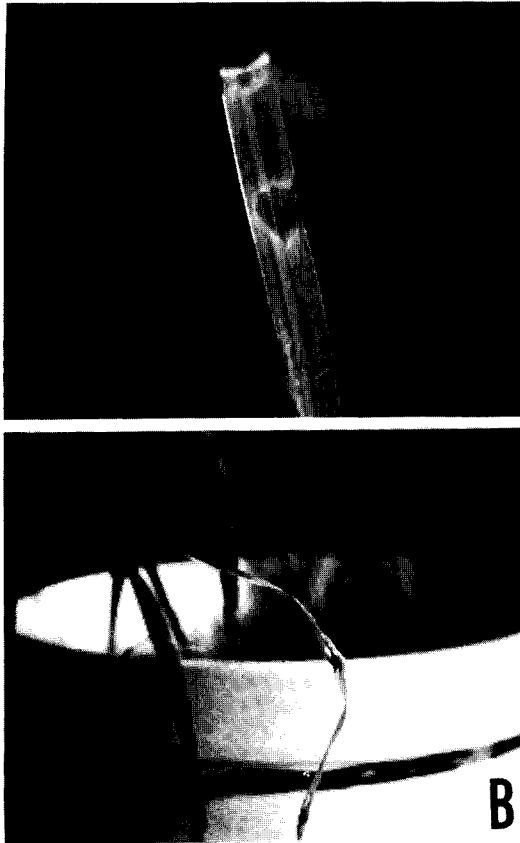


Fig. 1. Phytotoxic response of *Echinochloa crus-galli* to concentrated culture filtrate of *Exserohilum monoceras* isolate 92-044. A, Necrosis or chlorosis was developed at the dropping site after 48 hrs. B, The leaf of *E. crus-galli* was completely blighted within 5~7 days.

Table 1. The effect of media on phytotoxin production by *Exserohilum monoceras* isolate 92-044 from *Echinochloa crus-galli*

Media ^a	Mycelial growth ^b (g)	Toxicity : dilution endpoint ^c
PDB	0.47±0.08	2
CDB	0.45±0.03	8
MFLM	0.59±0.02	8
ECH	0.10±0.01	64
V-8 juice	0.44±0.06	128

^a PDB = potato dextrose broth, CDB = Czapek-Dox broth, MFLM = modified Fries liquid medium, ECH = natural host medium from *Echinochloa crus-galli*

^b Average fresh wt. per flask, shown by X±S.E.

^c Maximum dilution of culture filtrate that gave definite lesions (necrosis or chlorosis) on test leaves of seedlings. Highest dilution in the test was 1024.

Table 2. Comparison of phytotoxin production between shaking and still culture of *Exserohilum monoceras* isolate 92-044^a

Days after Incubation	Shaking culture		Still culture	
	Mycelial growth ^b (g)	Toxicity : ^c dilution endpoint	Mycelial growth (g)	Toxicity : dilution endpoint
3	0.21±0.05	16	0.11±0.01	16
6	0.46±0.03	64	0.42±0.03	32
9	0.44±0.07	64	0.45±0.04	64
12	0.43±0.06	128	0.49±0.01	128
15	0.45±0.09	64	0.49±0.02	64

^a Four replicate cultures (50 ml 20% V-8 juice medium/250 ml flask) were grown with the stroke of 150 rpm or still culture at 28 °C.

^b Average fresh weight per flask, shown by X±S.E.

^c Maximum dilution of cultural filtrate that gave definite lesions (necrosis or chlorosis) on test leaves of seedlings.

치는 진탕효과를 없는 것으로 나타났다(Table 2).

이 균의 독소생성을 위한 최적 pH조건을 조사하기 위한 실험 결과 배지의 pH의 변화에 따른 독소활성의 차이는 없었으며, 수소이온 농도가 독소생성에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

배양기간에 따른 균생장량을 조사한 결과 배양 6일까지는 급속히 증가하였으며, 배양 11일째 최고 균생장을 보였고 이후 감소하는 경향을 보였다. 한편 독소

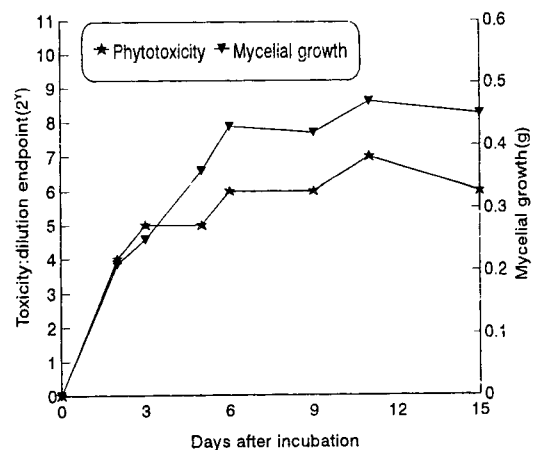


Fig. 2. Fresh weight and toxin production of *Exserohilum monoceras* isolate 92-044 grown in a 20% V-8 juice. Toxin production was determined by dilution endpoint with leaf bioassay using *Echinochloa crus-galli*. Toxin production and mycelial fresh weight measurements were mean of three replicate.

고찰

의 생장은 배양 2일 후부터 시작되어, 배양 11일 후까지 지속적으로 증가하였으며 11일 이후에는 낮아지는 경향을 보였다(Fig. 2).

독소의 기주범위. 벼를 포함한 10과 13종의 작물과 2과 7종의 잡초에 대한 독소반응을 관찰한 결과, 벼는 접종 48시간 후 약간의 황화증상이 관찰되었으나, 그 이후 더 이상 진전되지 않았고, 벼과 잡초인 새와 바랭이에서도 벼에서와 마찬가지로 약간의 황화가 관찰되었을 뿐이었다. 공시작물중에서는 토란에서만 유일하게 괴사현상을 관찰할 수 있었으나 그 외의 공시작물에서는 독소반응이 전혀 관찰되지 않았고 사초과 잡초인 올방개, 너도방동산이, 올챙이고랭이에서도 독소반응이 관찰되지 않았다(Table 3).

이 실험에서 *E. monoceras*의 배양여액을 잎표면에 직접 점적하였을 때 피의 엽조직을 괴사시키는 전형적인 독소반응을 관찰하였는데, 이는 최근 Zhang 등(22)이 *E. monoceras*의 cell-free 배양여액에 2엽기의 피 유묘를 침지함으로써 피가 고사하는 것을 관찰, 병징발현에 독소가 관여할 가능성을 보고한 것과 같은 결과였다. 이 증상은 Aldridge 등(1)과 정 등(3)이 피의 이병엽에서 분리한 *E. monoceras*를 접종하였을 때 피의 잎에 황화증상을 동반한 방추형의 반점을 형성한다고 한 증상과 거의 동일한 것이었다.

일반적으로 균생장과 독소생성에 적합한 조건은 같지 않을 수도 있으며, 합성배지보다는 화학적 조성이

Table 3. The phytotoxic effect of culture filtrate from *E. monoceras* on selected plant species

Plant Family	Species/(common name)/cultivar	Phytotoxin response ^a
Araceae	<i>Colocasia antiquorum</i> var. <i>esculenta</i> (taro)	+
Compositae	<i>Lactuca sativa</i> (lettuce)	-
Convolvulaceae	<i>Ipomoea batatas</i> (sweet potato)	-
Cruciferae	<i>Raphanus sativus</i> var. <i>hortensis</i> (radish)	-
Cucurbitaceae	<i>Cucumis melo</i> var. <i>makuwa</i> (melon)	-
	<i>Cucurbita moschata</i> (pumpkin)	-
Cyperaceae	<i>Cyperus amuricus</i> MAXIM.	-
	<i>Scirpus juncoides</i> ROXB. (Bulrush)	-
	<i>Eleocharis kuroguwai</i> OHWI (water chestnut)	-
Gramineae	<i>Oryza sativa</i> (rice)	
	Dongjinbyeo	±
	Hwanambyeo	±
	Hwasungbyeo	±
	Hwayeongbyeo	±
	Ilmbyeo	±
	Ilpumbyeo	±
	Kumnambyeo	±
	Milyang 123	±
	Samgangbyeo	±
	Yeongnambyeo	±
	<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>hexastichon</i> (barley)	-
	<i>Triticum aestivum</i> (wheat)	-
	<i>Arundinella hirta</i> (THUNB.) TANAKA	±
	<i>Digitaria sanguinalis</i> SCOP. (henry crabgrass)	±
	<i>Echinochloa crus-galli</i> P. BEAUV (barnyardgrass)	+++
	<i>E. crus-galli</i> var. <i>caudaza</i> KITAGAWA (")	+++
Labiatae	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>japonica</i> (perilla)	-
Liliaceae	<i>Allium fistulosum</i> (welsh onion)	-
	<i>Allium tuberosum</i> (chinese chive)	-
Rosaceae	<i>Fragaria ananassa</i> (strawberry)	-

^a Phytotoxin responses were evaluated as follows: -, no reaction, ±; resistant, +; moderately resistant, ++; moderately susceptible, +++; susceptible.

복잡한 반합성배지 혹은 천연물 배지에서 독소생성이 더 많은 경우가 보고되어 있다(7). 이 실험에서도 최대 균생장 배지와 최대독소생성 배지는 다르게 나타났으며, 또한 최대균생장을 보인 MFLM배지에서보다 균생장이 가장 적었던 ECH배지에서 독소생성이 오히려 높게 나타난 것은 Robeson 등(20)이 *Alternaria helianthi*가 생산하는 독소인 deoxyradicinin의 생산량과 배지속의 해바라기 잎추출물 함량과의 관계를 비교한 실험에서 고찰한 것처럼, 균생장량이 증가함에 따라 1차대사산물도 증가하고 이것에 의해 2차대사산물인 독소의 생성이 억제되는 현상과 관련이 있는 것으로 생각된다. 균생장과 독소생성 정도의 경시적 변화는 일치하는 경향이었으며, 최대생장 이후로는 오히려 감소하는 경향이였다. 이러한 현상은 Ludwig의 *Helminthosporium sativum* P.K. & B.의 독소생산실험 결과에서 처럼(15), 최대균생장에 도달한 이후 배지 속의 당함량이 고갈되어 균생장이 정지하거나 혹은 독소성분의 파괴현상이 일어나기 때문으로 생각된다.

*E. monoceras*의 cell-free 배양여액에 대한 독소반응 결과는 Table 3에서와 같이 피가 고도의 감수성 반응을 나타낸 반면, 벼는 강한 저항성 반응을 보여주었는데, 정 등(3)의 병원균 접종실험 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. Zhang 등(22)도 *E. monoceras*는 벼에는 병원성이 없고, 피에는 아주 강한 병원성을 나타내는 것으로 보고했다.

*E. monoceras*가 생산하는 monocerinin은 보리 흰가루병균에 대해 항균활성이 있으며, 식물독성에 관한 보고도 있으나, 피에 대한 식물독성의 직접적인 보고는 없으며, 이 실험의 피에 대한 식물독성이 monocerinin에 의한 것인지는 추후 검정이 필요할 것으로 생각된다.

요 약

E. monoceras 92-044균주의 배양여액 농축액을 피의 잎에 점적처리하여 독소반응을 관찰하였다. 접종 48시간 후 점적부위가 괴사 또는 황화되기 시작하였으며, 접종 5~7일 후에는 잎 전체가 고사하였다. 독소생산을 위한 배양조건을 조사하기 위해서 배지의 종류, 진탕배양과 정지배양, 배양시간의 경과에 따른 독소활성을 dilution endpoint로써 비교한 결과, V-8 juice 배지에서 독소활성이 가장 높았고, 배양 11일에 최대 균생장 및 독소생성량을 나타내었으며, 독소생성에 대한 진탕효과는 없는 것으로 나타났다. 벼를 포함한 13종의 작물과 피등 7종의 잡초에 대해서 독소반응을 조사한 결과, 접종 48시간후 피에서는 뚜렷한

독소반응이 관찰된 반면, 벼와 바랭이, 새에서는 약간의 황화증상이 관찰되었으나, 이후 더 이상의 병징진전은 없었다.

참고문헌

1. Aldridge, D. C., and Turner, W. B. 1970. Metabolites of *Helminthosporium monoceras*: structures of monocerinin and related benzopyrans. *J. Chem. Soc. C*: 2598-2600.
2. Calam, C. T. 1969. *Methods in Microbiology*. Academic Press, London and New York. 573 pp.
3. Chung, Y. R., Kim, B. S., Kim, H. T., and Cho, K. T. 1990. Identification of *Exserohilum* species, a fungal pathogen causing leaf blight of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Korean J. Plant Pathol.* 6: 429-433.
4. Cutler, H. G. 1995. Microbial natural products that affect plants, phytopathogens, and certain other microorganisms. *Crit. Rev. Pl. Sci.* 14(5): 413-444.
5. De Datta, S. K. 1981. *Principles and Practices of Rice Production*. John Wiley & Sons New York.
6. Duke, S. O., and Lydon J. 1987. Herbicides from natural compounds. *Weed technology* 1: 122-128.
7. Durbin, R. D. 1981. *Toxins in Plant Disease*. Academic Press, London and New York. pp. 21-40.
8. Gilchrist, D. G., and Grogan, R. G. 1975. Production and nature of a host-specific toxin from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology* 66: 165-171.
9. Gohbara, M., and Yamaguchi, K. 1994. Biological control agents for rice paddy weed management in Japan. In: *Integrated Management of Paddy and Aquatic Weeds in Asia*, ed. by H. Shibayama, K. Kiritani, and J. Bay-Petersen, pp. 184-194. FFTC Book series No. 45. Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region, Taipei.
10. Goto, M. 1994. The relationship between *Emmalocera* sp. and barnyardgrass and its potential as a biological control. In: *Integrated Management of Paddy and Aquatic Weeds in Asia*, ed. by H. Shibayama, K. Kiritani, and J. Bay-Petersen, pp. 113-121. FFTC Book Series No. 45. Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region, Taipei.
11. Holm, L. G., Plucknett, D. L., Pancho, J. V., and Herberger, J. P. 1977. *The World's Worst Weeds*. The University Press of Hawaii, Honolulu.
12. Hong, Y. K., Cho, J. M., Kim, J. C., and Uhm, J. Y. 1995. Identification, pathogenicity and host range of a potential bioherbicides *Epicoccossorus nematosporus*, causing fingerprint stem blight on water

- chestnut, *Eleocharis kuroguwai*. *Korean J. Plant Pathol.* 12(1): 58-65.
13. Jin, H., Hartman, G. L., Nickell, C. D., and Windholm, J. M. 1996. Characterization and purification of a phytotoxin produced by *Fusarium solani*, the causal agent of soybean sudden death syndrome. *Phytopathology* 86: 277-282.
 14. Kenfield, D., Bunkers, G., Strobel, G. A., and Sugawara, F. 1988. Potential new herbicides-phytotoxins from plant pathogens. *Weed technology* 2: 519-524.
 15. Ludwig, R. A. 1957. Toxin production by *Helminthosporium sativum* P. K. & B. and its significance in disease development. *Can. J. Botany* 35: 291-303.
 16. Luke, H. H., Wheeler, H. E. 1955. Toxin production by *Helminthosporium victoriae*. *Phytopathology* 45: 453-458.
 17. Moody, K. 1989. *Weeds Reported in Rice in South and Southeast Asia*. International Rice Research Institute, P. O. Box 933, Manila, Philippines.
 18. Onkar, D. D., James, B. S. 1995. *Basic Plant Pathology Methods*(Second Edition). In: *Cultivation and Sporulation Media*. CRC Press, Boca Raton, London and Tokyo. 252 pp.
 19. Robeson, D. J., and Strobel, G. A. 1982. Monocerin, a phytotoxin from *Exserohilum turcicum* (*Drechslera turcica*). *Agric. Biol. Chem.* 46: 2681-2683.
 20. Robeson, D. J., and Strobel, G. A. 1986. The influence of plant extracts on phytotoxin production and growth rate of *Alternaria helianthi*. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg. pp. 265-269
 21. Smith, R. J. Jr. 1983. Weeds of major economic importance in rice and yield losses due to weed competition. In: *Weed Control in Rice*, pp. 19-36. International Rice Research Institute, P. O. Box 933, Manila, Philippines.
 22. Zhang, W. M., Moody, K., Watson, A. K. 1996. Responses of *Echinochloa* Species and Rice (*Oryza sativa*) to Indigenous Pathogenic Fungi. *Plant Disease* 80: 1053-1058.

(Received March 27, 1997)