

감자역병균(*Phytophthora infestans*)의 단일 포자낭으로부터 형성된 균총의 Metalaxyl과 Streptomycin Sulfate 내성 변화

이용훈 · 이왕휴¹⁾ · 이두구 · 심형권

농촌진흥청 호남농업시험장 · ¹⁾전북대학교 농과대학 생물자원과학부

Variation in Metalaxyl and Streptomycin Sulfate Resistance of Isolates Formed from Single Sporangium of *Phytophthora infestans*

Yong-Hoon Lee, Wang-Hyu Lee¹⁾, Doo-Ku Lee and Hyeong-Kwon Shim(Honam Agricultural Experiment Station, RDA, Iksan, Chonbuk, 570-080 Korea ; ¹⁾College of Agriculture, Chonbuk National University, Chonju, 560-756 Korea)

Abstract : Parent isolates and first-generation(F₁) progenies from single-sporangium of *Phytophthora infestans* were investigated for the acquisition of metalaxyl and streptomycin sulfate(SM) resistance. The parent isolates, KM10, U6, CDB6 showed resistance to metalaxyl, and F817, DNC303, DN107 to SM. Especially, the average mycelial growth of F₁ progenies of F817, CDB6, JD1 was more than 51% than parent isolates on 25ppm metalaxyl added V-8 juice agar, whereas those of KM10, U6, JD1 were extended more than 51% similar on 200ppm SM treatment. They acquired resistance on the basis of the standard in this experiment. There were positive correlations between parent isolates and F₁ colonies in resistance. The F₁ colonies obtained from parent isolates showing above intermediate resistance on metalaxyl amended agar acquired much resistance.

Key words : *Phytophthora infestans*, resistance, metalaxyl, streptomycin sulfate.

서 론

Phytophthora infestans(Mont.) de Bary는 감자, 토마토, 가지 등에 역병을 일으키는데, 일단 발병되면 급격하게 병이 진전되어 큰 손실을 일으키는 중요 병해 중의 하나이다. 우리나라에서도 최근 거의 모든 감자 재배 포장에서 이 병이 발생되고 있으며¹⁾, 병원균의 생리, 생태 및 병의방제를 위한 발생예찰, 교배형 분포, 약제 시험 등에 관한 연구가 다수 보고되어 있다.^{1~3)}

현재 역병의 방제에 가장 효과적인 방법은 약제에 의한 방제인데, acylalanine계 살균제인 metalaxyl, furalaxyl과 그 외 fosetyl-Al, propamocarb, chlorotharonyl, mancozeb 등이 사용되고 있다. 이 중 경엽처리 및 토양관주에서도 효과적인 방제 효과를 나타내는 acylalanine계 살균제인 metalaxyl은 1979년 유럽에서 역병 방제를 위해 사용되었는데, 1980년 네덜란드⁴⁾와 아일랜드⁵⁾에서 내성균이 최초로 발견 보고되었다. 그후, 내성균에 관한 보고가 세계적으로 이루어지고 있으며^{6~9)}, 국내에서도 이 등³⁾, 소¹⁰⁾와 최 등²⁾이 metalaxyl 저항성을 보고한 바 있다.

이에따라 본 실험에서는 내성을 획득한 균주로부터 포자낭을 받아시켜 형성된 균총의 내성 획득 여부를 조사하고자, 모계균주의 metalaxyl 내성 정도를 조사하고, 모계균주를 metalaxyl 첨가 배지에 배양하여 내성을 유도하여 포자낭을 형성시킨 다음 단일 포자낭을 받아시켜 후대균총을 형성

시켰다. 이후 metalaxyl에 대한 후대의 내성 변화 여부를 조사하였으며, 그 변화 양상을 비교하고자 streptomycin sulfate(SM)에 대해서도 이와 동일한 방법으로 비교 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주

균주는 국내에서 분리한 A²형인 KM10, U6, CDB6, MHB6, JD1 균주와 일본에서 분양 받은 A¹형인 F817, DNC303, A²형인 IB908, DN107 균주를(Table 1) rye a 배지에¹¹⁾ 보관하면서 각 실험에 공시하였다.

Table 1. Mating type and geographic origin of the isolates of *Phytophthora infestans*.

Isolate	Mating type	Geographic origin
F817	A ¹	Japan*
DNC303	A ¹	Japan
KM10	A ²	Kimje
U 6	A ²	Unbong
MHB6	A ²	Milyang
CDB6	A ²	Changwon
JD 1	A ²	Cheju
IB908	A ²	Japan
DN107	A ²	Japan

* Obtained from Hokkaido University, Sapporo, Japan.

모균주의 약제 내성 반응

역병균의 방제에 이용되는 metalaxyl에 대한 내성 여부를 조사하기 위하여 공시균주를 V-8 juice 한천배지에 예비 접종하여 1주일간 배양한 뒤 metalaxyl 원제(Ciba Geigy Co. 94.5%)를 25 μ g/ml 첨가한 회석 평판 배지에 직경 5mm의 corkborer를 이용하여 균총의 선단부를 떼어 내어 접종한 다음 20 $^{\circ}$ C, 암상태에서 10일간 배양한 후 균사 신장 정도를 3반복 측정하였다.

한편, metalaxyl이외에 역병균이 감수성을 나타내는 항생제인 streptomycin sulfate에 대한 내성 여부를 조사하기 위하여, 200 μ g/ml의 SM이 첨가된 회석 평판 배지에 접종하여 metalaxyl과 동일한 방법으로 균사 신장 정도를 조사하였다.

후대균총의 약제내성 변화

단일 포자낭에 의해 얻은 후대균총의 내성 획득 여부를 조사하기 위하여 포자낭의 형성 및 발아를 위해 rye a와 b 배지를 기본으로하여,¹¹⁾ 진균 오염방지를 위해 PCNB 1 μ g/ml, pimarinic 100 μ g/ml를, 세균 억제제를 위해 vancomycin 100 μ g/ml과 rifamycin 50 μ g/ml를 첨가하여 사용하였다.

Metalaxyl과 SM이 각각 25, 200 μ g/ml 첨가된 rye a 평판 배지에 각 공시균주를 접종하여 20일간 20 $^{\circ}$ C, 암상태에서 배양하여 포자낭 형성을 확인한 다음, 멸균 증류수를 소량 첨가한 후 가볍게 흔들어 포자낭을 분리시켰다. 멸균주사기로 포자낭이 포함된 증류수를 채취한 후 포자낭을 10²~10³ 개/ml 농도로 희석하여 0.2ml를 rye b 배지에 부은 후 유리봉으로 도말 하였다. 그 다음 22 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양하여 발아 상황을 관찰한 후 10~14일 정도 보관하여 발아된 단일 포자낭을 배지 채 떼어내 rye a 배지에 이식한 후 배양하여 균총을 형성시켰다.

이 F₁세대 균주들을 바로 V-8 juice agar에 예비배양하여 모균주의 약제 내성반응 조사와 동일한 방법으로 metalaxyl과 SM에 대한 내성 변화여부를 조사, 비교하였다.

결 과

모균주의 약제내성 반응

각 공시균주의 균사 신장을 측정하여 metalaxyl(25 μ g/ml) 첨가 배지에서 무처리대비 10%이하 신장한 균주를 감수성(sensitivity), 31%이상 신장한 것을 내성(resistance), 11~30%신장한 것을 준내성(intermediate resistance)으로 정하고, SM(200 μ g/ml)첨가 배지에서는 30% 이하 신장한 균주를 감수성, 51%이상을 내성, 31~50%를 준내성으로 구분하여 내성 정도를 판단하였다.

그 결과(Table 2) metalaxyl에 DNC303, IB908, DN107 균주가 감수성을 F817, MHB6, JD1균주가 준내성을, KM10, U6, CDB6균주가 metalaxyl을 첨가하지 않은 V-8 juice 한천배지의 균사신장에 비하여 각각 46.1, 33.1, 40.7%의 균사신장을 보여, 본 실험의 내성기준에 의한 metalaxyl 내성이 인정되었다. 한편, SM에 대해서는 KM10, U6, MHB6, JD1, IB908이 감수성을, CDB6이 준내성을, F817, DNC303, DN107균주가 SM을 첨가하지 않은 V-8 juice 한천배지에서의 균사신장에 비하여 각각 52.7, 66.1, 58.2% 신장하여 본 논문에서의 내성기준에 따라 내성균주로 분류하였다.

Table 2. Effect of metalaxyl and Streptomycin sulfate on mycelial growth of parent isolates of *Phytophthora infestans*.

Isolate	Control	Metalaxyl	Relative growth(%) (B/A)	SM Class (200 μ g/ml) (C)	Relative growth(%) (C/A)	Class	
	(A)	(B)					
F817	34.7	5.7*	16.4	IR**	18.3*	52.7	R**
DNC303	22.7	3.3	9.7	S	15.0	66.1	R
KM10	23.7	10.6	46.1	R	5.0	21.1	S
U 6	36.3	12.0	33.1	R	8.7	24.0	S
MHB6	36.7	7.3	19.9	IR	7.3	19.9	S
CDB6	25.3	10.0	40.7	R	8.3	32.8	IR
JD 1	23.7	2.7	11.4	IR	5.3	22.4	S
IB908	29.3	2.0	6.8	S	5.7	19.5	S
DN107	28.7	1.8	8.0	S	16.7	58.2	R

* Mean of 3 experiment on V-8 juice agar incorporated with metalaxyl(25 μ g/ml) and streptomycinsulfate(200 μ g/ml) pycelial growth(mm) was measured after 10 days of incubation.

** R, IR and S stand for resistance, intermediate resistance and sensitivity, respectively.

후대균총의 약제내성 변화

Metalaxyl과 SM이 각각 첨가된 배지에서 형성시킨 단일 포자낭을 발아시켜 각 공시균주 F817, DNC303, KM10, U6, MHB6, CDB6, JD 1, IB908, DN107로부터 각각 10, 6, 8, 13, 14, 12, 4, 6, 6개의 후대균총을 형성시켜 총 79균주를 내성변화 시험에 사용하였다(Table 3).

*P. infestans*는 동일한 균주로부터 분리해 내어 배양한 분리체 사이에서도 균사 신장 속도나 균총의 형태에 있어서 변이가 심한 편인데, 동일한 균주에서 형성시켜 분리된 단일 포자낭에 의해 형성된 균총들 사이에서도 약간의 변이가 있었다. 발아는 균주에 따라 약간의 차이가 있었으나, 비교적 양호한 편이었다.

이들 후대균총의 균사신장 정도를 측정하여 평균한 후 모균주보다 평균 51%이상 더 신장한 균주를 내성을 획득한

Table 3. The number of first-generation progenies derived from single sporangium of parent isolates.

Isolates	F817	DNC303	KM10	U 6	MHB6	CDB6	JD 1	IB908	DN107	Total
No. of F ₁ progeny	10	6	8	13	14	12	4	6	6	79

Table 4. Comparison of mycelial growth between parent isolates and their F₁ progenies produced on V-8 juice agar incorporated with metalaxyl and streptomycin sulfate.

Isolates	Mycelial growth(mm/10 days)* at					
	metalaxyl(25µg/ml)			SM(200µg/ml)		
	parent (A)	progeny mean(B)	B/A (%)	parent (C)	progeny mean(D)	C/D (%)
F817	5.7	12.2	214.0	18.3	24.0	131.2
DNC303	3.3	4.5	136.4	15.0	13.1	87.3
KM10	10.6	11.4	107.5	5.0	7.8	156.0
U 6	12.0	14.2	118.3	8.7	19.2	220.7
MHB6	7.3	10.8	144.5	7.3	8.9	121.9
CDB6	10.0	20.4	198.1	8.3	10.1	121.7
JD 1	2.7	12.5	463.0	5.3	8.5	160.0
IB908	2.0	2.2	110.0	5.7	8.0	140.7
DN107	2.3	3.0	130.4	16.7	15.7	94.0
Average	6.9	10.1	180.2	18.0	12.8	137.1

* Mean of 3 experiment on V-8 juice agar incorporated with metalaxyl(25µg/ml) and streptomycin sulfate(200µg/ml).

것으로 판단하였다. 그 결과(Table 4) F817, CDB6, JD1 균주가 모균주에 비하여 각각 214.0, 198.1, 463.0% 더 신장하여 metalaxyl에서 내성을 획득하였고, SM에는 KM10, U6, JD1균주가 모균주보다 156.0, 220.7, 160.0% 더 신장하여 내성을 획득한 것으로 판단되었다. 한편, 후대균총은 모균주에 비하여 metalaxyl 첨가 배지에서 평균 180%, SM 첨가 배지에서 137% 더 신장하여 metalaxyl 첨가 배지에서 더 신장한 것을 볼 수 있었다. 이들의 상관성을 조사한 결과 metalaxyl의 경우는 $r=0.741^*$ 로서 5%의 유의성이 인정되었고, SM의 경우는 $r=0.781^{**}$ 로서 1%의 고도 상관성이 인정되었다. 한편, SM의 경우에는 본 실험에서의 모균주의 내성 정도와 관련없이 전체적인 후대균총의 내성 획득이 무작위적으로 이루어지는 경향이 있었다. 반면 metalaxyl의 경우 준내성 이상을 보였던 균주들의 후대균총에서만 내성을 획득하는 경향을 보였고, 감수성 균주로부터 형성된 후대균총은 변화가 적었으나, 준내성 이상을 보인 균주로부터 형성된 후대균총은 내성변화 폭이 커 모균주의 내성정도보다 후대균총의 내성획득 정도에 관련이 있었다.

고 찰

본 실험에서는 metalaxyl첨가 배지에서는 무처리 대비 10%이하, 11~30, 31% 이상 신장한 것을, SM첨가 배지에서는 30%이하, 31~50%, 51% 이상 신장한 것을 기준으로 하여 감수성, 준내성, 내성으로 구분하였다. 그런데, 이는 Shattock^{12,13)}이 metalaxyl 10µg/ml 농도에서 무처리대비 10%이하, 11~60, 61% 이상을 기준으로 나누어서 조사하였던 것과 Therrien¹⁴⁾ 등이 metalaxyl 5µg/ml 농도에서 40% 이상 신장하고, 100µg/ml 농도에서 40% 미만으로 신장한 것을 준내성으로 그 이하와 이상 신장한 것을 감수성과 내성으로

구분하였던 것과는 그 기준에 있어 약간의 차이가 있었는데 이는 균사신장을 70~80% 억제하는 정도와 각 약제별 농도 시험을 통해 정했다. 그러나, 이 등³⁾은 약제의 농도여부와 생장정도로 내성을 결정하고 있으므로 차후 약제 내성의 기준에 대한 정확한 검토가 필요하다 생각된다.

포자낭의 발아는 배지상에서도 형성시킬 수 있다고 알려져 있었는데, 포자낭 발아시 Caten¹¹⁾ 등의 결과에서와 같이 포자낭 발아시 온도가 18°C 이하가 될 때는 발아율이 저조하였고, 유주자낭을 형성하여 유주자를 방출하는 경우가 있어 직접 발아를 유도할 때는 온도조절에 대한 주의가 필요하였다.

한편, 일본균주는 F817을 제외한 3균주가 metalaxyl에 감수성이었으며, IB908균주를 제외한 균주들은 SM에 저항성을 나타냈다. 국내산 균주의 경우, metalaxyl 사용으로 인한 타인지 준저항성 또는 저항성이었으나, SM에 대해서는 CDB6 균주만이 준저항성이었고, 나머지는 감수성을 나타내 대부분의 국내산 역병균이 SM에 대해서는 감수성으로 판명되었다. 따라서 이들의 원인이 양국의 농약사용의 차이로 인한 것인지에 대한 연구가 요구된다.

각 모균주의 단일 포자낭으로부터 형성된 균총들을 살펴 보았을 때 SM의 경우나 metalaxyl의 경우 거의 모든 후대균주가 모균주보다 균사신장속도가 빠르고, 모균주보다 51% 이상 신장한 균주가 다수 존재하였는데 이는 무성적으로도 약제에 대한 내성을 획득할 수 있음을 시사해 준다. 또, metalaxyl 처리의 모균의 모균주와 F₁ 간에는 $r=0.741^*$, SM처리에서는 $r=0.781^{**}$ 로서 상관관계가 있었다. 이는 모균주의 내성 정도와는 상관없이 무작위적으로도 이루어질 수 있을 것이다. 한편, metalaxyl의 경우 내성을 나타낸 균주에서 형성된 후대균주에서의 내성획득정도가 큰 것으로 보아 약제에 노출된 후 내성을 획득하였던 균들이 후대균을 통하여 내성을 유전시킬 가능성이 높다. 따라서 재배적 방제법이나 타 약제와의 교호살포 등을 통하여 약제의 연용을 피할 필요가 있을 것으로 판단된다.

요 약

Metalaxyl 과 streptomycin sulfate(SM) 내성 획득여부를 알아보기 위해 감자역병균의 모균주와 단일 포자낭에서 얻은 F₁세대에 대한 반응을 조사하였다. 모균주 KM10, U6, CDB6 은 metalaxyl에 내성을 보였으며, F817, DNC303, DN107 균주는 SM에 내성을 나타냈다. 약제에 노출시킨 단일 포자낭에서 얻은 F₁세대는 모균주보다 생육이 양호하였다. 특히, F817, CDB6, JD1의 F₁세대는 metalaxyl 처리배지에서 대조구보다 51%이상 신장하였고, KM10, U6, JD1의 F₁세대는 모균주보다 SM처리에서 51%이상 신장하였다. 이것들은 본 실험의 표준에 의하면 내성을 획득하였다. 또 모균주와 F₁세대간에는 약제저항성에 정의 상관관계가 있었다. Metalaxyl의 경우 SM의 경우보다 준내성 이상을 보인 모균주

로부터 얻은 F₁세대의 내성 획득 정도가 더 큰 경향을 보였다.

참고문헌

1. 소만서, 이왕휴. (1993). 감자역병균 *Phytophthora infestans*의 A² 교배형의 발생. 한식병지 9(4) : 275~279.
2. 최경자, 김병섭, 정영륜, 조광연. (1992). 감자 재배포장에서 Metalaxyl 저항성 감자역병균(*P. infestans*)의 발생. 한식병지 8(1) : 34~40.
3. 이왕휴, 소만서, 소인영. (1991). 감자역병균의 A²형 출현 및 메타락실 저항성. 한식병소식지. 2(2) : 44.
4. Davidse, L.C., Henken, J., Van Dalen, A., Jespers, A.B. K., and, Mantel, B.C. (1989). Nine years of practical experience with phenylamide resistance in *P. infestans* in the Netherlands. Neth. J. Pl. Path. 95 Supplement 1 : 197~213.
5. Dowley, L.J., and O'sullivan, E. (1981). Metalaxyl-resistance strains of *P. infestans*(Mont.) de Bary in Ireland. Potato. Res. 3/24 : 417~421.
6. Bashan, B., Kadish, D., Levy, Y., and Cohen, Y. (1989). Infectivity to potato, sporangial germination, and respiration of isolates of *P. infestans* from metalaxyl-sensitive and metalaxyl-resistance populations. Phytopathology 79 : 832~836.
7. Cohen, Y., and Reuveni, M. (1983). Occurrence of metalaxyl resistance isolates of *P. infestans* in potato fields in Israel. Phytopathology 73 : 925~927.
8. Davidse, L.C., Danial, D.L., and Van Westen, C.J. (1983). Resistance to metalaxyl in *P. infestans* in the Netherlands. Neth. J. Pl. Path. 89 : 1~20.
9. Holmes, S.J.I., and Iselin, K. (1984). Studies on metalaxyl-resistant *P. infestans* in potato crops in southwest Scotland. Plant Pathology 33 : 347~354.
10. 소만서. (1993). 감자 역병균의 교배형 및 약제 저항성. 전북대학교 대학원 석사학위 논문. 1~23.
11. Caten, C.E., and Jinks, J.L. (1968). Spontaneous variability of single isolates of *P. infestans* I. Cultural variation. Can. J. of Botany 46 : 329~348.
12. Shattock, R.C. (1988). Studies on the inheritance of resistance to metalaxyl in *P. infestans*. Plant Pathol. 37 : 4~11.
13. Shattock, R.C., Shaw, D.S., Fyfe, A.M., Dunn, J.R., Loney, K.H., and Shattock, J.A. (1990). Phenotypes of *P. infestans* collected in England and Wales from 1985 to 1988 : mating type, response to metalaxyl and isozyme analysis. Plant pathol. 39 : 242~248.
14. Therrien, C.D., Tooley, D.E., Spifman L.J., Fry, W.E., Ritch, D.L., and Shelly S.E. (1993). Nuclear DNA content, allozyme phenotypes and metalaxyl sensitivity of *P. infestans* from Japan. Japan Mycol. Res. 97 : 945~950.