

고추 탄저병균 *Colletotrichum acutatum*의 포장 밀도 조사를 위한 반선택 배지의 확립 및 활용

강범관 · 민지영¹ · 김윤식² · 박성우 · Nguyen Van Bach · 김흥태*

충북대학교 농업생명환경대학 식물의학과

¹Department of Plant Pathology, The University of Nebraska, Lincoln, NE, 68501, USA

²전북대학교 생명과학부

Semi-selective Medium for Monitoring *Colletotrichum acutatum* Causing Pepper Anthracnose in the Field

Beum Kwan Kang, Ji Young Min¹, Yun Sik Kim², Sung Woo Park,
Nguyen Van Bach and Heung Tae Kim*

Department of Plant Medicine, College of Agriculture, Life and Environment Sciences,
Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

¹Department of Plant Pathology, The University of Nebraska, Lincoln, NE, 68501, USA

²Research Center of Bioactive Materials, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

(Received on May 18, 2005)

It was confirmed that anthracnose pathogen, *Colletotrichum acutatum*, could specifically grow on PDA amended with 100 µg/ml of ampicillin and tetracycline, and 100 µg/ml of mixture with carbendazim and diethofencarb. There was a positive correlation between the number of colony enumerated on semi-selective media and the disease severity on pepper fruits caused by *C. acutatum*. Using semi-selective media for *C. acutatum*, the number of pathogen on soil and plant debris infected by anthracnose pathogen was investigated. In plant debris, the colony number of *C. acutatum* was more than in soil. For the identification of colony appeared on semi-selective media, 10 isolates were selected randomly. They were identified as *C. acutatum* through PCR using *C. acutatum*-specific primer.

Keywords : *Colletotrichum acutatum*, Pepper anthracnose, Semi-selective media

고추는 주곡인 쌀을 제외하고 단일 작물로서는 그 생산액이 가장 큰 작물로서 2002년의 생산액이 1조 430억에 달하고 있다. 이러한 고추의 병해 중에서는 탄저병은 매우 중요한 병해이며, 매년 이 병에 의한 생산량의 감소가 심각한 상태이다. 특히 고추 탄저병은 7월 초순과 중순경부터 열매에 발생하기 시작하여 8월과 9월을 지나면서 급격히 발생량이 증가하는 것으로 보고되어 있다. 탄저병은 고추의 열매에 괴저 증상을 보임으로써 직접적으로 수량감소와 품질 저하에 영향을 미치는 병으로 한국,

인도, 인도네시아, 중국 남부와 같은 장마기나 우기가 있는 몬순 기후대에서 막대한 피해를 입히고 있다. 국내의 경우 매년 총 생산액의 10% 이상(약 천억원), 중국의 경우 약 18%의 수량 손실이 보고되었으며, 경우에 따라서는 50~80%까지의 수량이 감소하기도 한다고 보고되었다 (Kim과 Park, 1988; Shin 등, 1999).

국내외 고추 탄저병균으로는 Park과 Kim(1992)이 *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. coccodes*, *C. dematium*, *C. acutatum*, 그리고 완전세대인 *Glomerella cingulata* 등이 보고되어 있다. *Colletotrichum*의 동정에는 전통적으로 형태적인 기준을 가지고서 실시하는 방법이 사용되어 분생 포자의 형태, 크기, 부착기의 모습, 균총의 형태와 색깔 등을 관찰하였지만, 전통적인 방법의 한계로 정확한 동정

*Corresponding author

Phone) +82-43-261-2556, Fax) +82-43-271-4414

E-mail) htkim@cbnu.ac.kr

이 이루어지기 어려운 점이 많았다(Freeman 등, 1998). 최근 ITS 영역의 DNA 상동성 비교와 종 특이적인 primer를 이용한 PCR 등을 통하여 고추 탄저병균의 주된 병원균이 *C. acutatum*임이 규명되었다. 그러나 포장에서 고추 탄저병균의 월동, 초기 전염원의 밀도, 전반의 방법과 포장에서의 병원균 밀도 변화 등 방제와 직접적인 연관을 갖는 역학 요소들에 대한 조사는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 고추 탄저병균은 공기보다는 비바람에 의해서 전파되는 것으로 보고되어 있는데, 일반적인 공기 전염성 식물병원균의 포장 밀도를 조사하기 위해서 사용하는 포자 채취기 등을 사용하여 포장의 병원균의 밀도를 조사하기에는 어려움이 많은 것으로 판단한다. 따라서 병원균을 정량적으로 조사할 수 있는 선택배지의 필요성이 대두되었다.

선택배지는 특정한 미생물만을 선택적으로 배양할 수 있을 뿐만 아니라 미생물을 양적으로 조사하는데도 사용할 수 있다. Viljoen 등(2004)은 yeast를 정량적으로 조사하기 위하여 yeast에 대한 선택 배지로 rose-bengal chloramphenicol agar, dichloran rose-bengal chloramphenicol agar, dichloran 18% glycerol agar, malt extract agar with biphenyl 등의 배지를 사용하여 치즈에서의 yeast의 수를 정량화하였다. Massart 등(2005)은 12.5 µg/ml hygromycine B, 0.25 µg/ml thiram, 5 µg/ml sumico를 첨가한 PDA 배지를 반선택 배지로 선발하여 *Botrytis cinerea*와 *Penicillium expansum*에 대한 생물적 방제 미생물인 *Candida oleophila* strain O를 모니터링하였다. De Cal 등(2005)은 methyl bromide로 소독한 토양에서 *Fusarium* spp. *Pythium* spp. *Verticillium* spp. 등의 밀도를 조사하기 위해서 각 토양 병원균의 선택 배지를 사용하였다. Ko 등(2005)은 lipase를 생성하는 미생물을 선발하기 위해서 0.01%의 tween 80 용액에 현탁시킨 0.1%의 sunflower oil을 첨가한 선택 배지를 사용하였다. 이처럼 선택 배지 또는 반선택 배지는 특정한 미생물의 선발과 정량화 등에 이용되고 있다. 식물병원균인 *C. acutatum*과 같은 탄저병균에 대해서도 Norman과 Strandberg(1997)는 토양과 leatherleaf fern의 잔재물에서 생존하는 병원균의 수를 정량화하기 위하여 PDA에 benomyl을 첨가한 반선택 배지를 사용하였다.

다주기성 식물병원인 고추 탄저병을 효율적으로 방제하기 위해서는 초기 전염원의 밀도를 감소시키거나 병 발생 속도를 낮추어야 한다. 따라서 탄저병균의 월동처, 월동 후 포장에서의 밀도 변화, 전반의 경로 등과 각 단계에서의 병원균의 양을 정량적으로 조사할 필요가 있다. 따라서 본 실험에서는 주요한 고추 탄저병균인 *C. acutatum*을 포장에서 쉽게 분리하고, 토양과 건전 또는 이병 식물

조직상에서의 병원균의 밀도를 조사하기 위해서 *C. acutatum*에 대한 반선택배지를 확립하고자 한다.

재료 및 방법

사용한 병원균. 탄저병균의 전형적인 증상을 보이는 고추에서 단포자 분리한 *C. acutatum* JC24와 *C. dematium*을 실험에 사용하였다. *C. gloeosporioides* KACC40690과 *C. coccodes*는 농촌진흥청에서 분양받아 실험에 사용하였다. 병원균들은 PD(Potato dextrose) 사면배지에 배양하여 4°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

사용한 배지. 주된 고추 탄저병균인 *C. acutatum*을 선택적으로 배양할 수 있는 배지를 확립하기 위하여 5종의 배지를 선발하여, 실험에 사용한 4종의 *Colletotrichum* 균주의 균사 생장 억제 정도를 조사하였다. 선발한 배지는 기본 배지(I)로 PDA를 사용하였으며, 항생물질과 살균제를 다른 미생물의 생육을 억제하는 억제제로 첨가하였다. 배지 II에는 PDA에 100 µg/ml의 ampicillin과 tetracycline을 첨가 하였으며, 배지 III에는 배지 II의 조성액에 100 µg/ml의 carbendazim과 diethofencarb의 혼합제를 첨가하였다. 배지 IV에는 배지 III에서 100 µg/ml의 carbendazim과 diethofencarb의 혼합제 대신에 100 µg/ml의 iprodione을 첨가하였으며, 배지 V에는 위에서 서술한 모든 억제제를 동일한 농도로 처리하여 사용하였다.

병원균의 균사 생장 억제 효과. 실험에 사용한 4종의 병원균은 모두 25°C의 암상태에서 배양하였다. 5일간 배양한 병원균들의 균사 선단에서 직경 5 mm의 균사 조각을 떼어내어 5종류의 배지의 중앙에 각각 접종한 후, 동일한 조건에서 5~7일간 배양하고 균사의 직경을 조사하였다.

포장에서 채집한 이병고추에서의 병원균 분리와 개체수 조사. 2003년 8월 중에 재배한 청풍명원 고추에서 고추 열매당 발병 면적률이 25% 이상(IV), 5~25% 사이(III), 5% 미만(II), 그리고 병징을 찾아볼 수 없는 고추(I)를 채집하여 병원균을 분리하고 개체수를 조사하였다. 고추 열매 생중량의 10배(w/v)되는 증류수에 열매를 넣고 blender를 이용하여 1분간 고르게 갈았다. 이렇게 수확한 고추 즙액은 4겹의 cheese cloth로 여과하여 찌꺼기를 제거하였다. 여과한 즙액은 3,000 g에서 10분간 원심분리하여 상정액은 제거하고, 침전물에 다시 증류수를 첨가한 다음 고르게 교반하여 현탁시켰다. 고추 열매의 현탁액은 적정 농도로 희석한 후에 반선택배지에 50 µl씩 도말하고, 25°C에서 1주일간 배양한 후에 나타난 균총의 수를 조사하였다. 실험에 사용한 반선택배지로는 PDA에 100 µg/ml의

carbendazim과 diethofencarb의 혼합 살균제를 첨가한 배지(A)와 100 µg/ml의 ampicillin과 tetracycline 항생물질을 첨가한 배지(B), 그리고 살균제와 항생물질을 모두 혼합한 배지(C) 등 세 종류의 배지를 사용하였다.

이병 잔재물과 토양에서 병원균의 분리와 개체수 조사. 2004년 2월 중에 전년도 고추를 재배한 포장에서 고추의 이병 잔재물을 채취하여 위에서 기술한 방법과 동일한 방법으로 반선택 배지를 이용하여 병원균을 분리하고 개체수를 조사하였다. 또한 탄저병 발생을 확인하였던 포장에서 토양을 채취하여 병원균 분리와 개체수 조사를 실시하였다. 채취한 토양 10 g을 250 ml의 증류수에 현탁시킨 후, 150 rpm으로 1시간 진탕하였다. 토양의 현탁액은 4겹의 cheese cloth에서 여과하여 토양의 잔재물을 제거하고, 반 선택배지에 바로 50 µl씩 도말하였다. 고추 열매의 경우와 동일하게 25°C에서 1주일간 배양한 후에 나타난 균총의 수를 조사하였다.

병원균의 동정. 반선택배지에서 선발한 병원균이 *C. acutatum*인지를 확인하기 위해서 종 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이병 고추와 토양에서 분리한 병원균의 균총을 새로운 PDA 배지에 접종하여 25°C의 암상태에서 10일간 배양하였다. 배지 표면에서 *C. acutatum*의 균사를 긁어 수확한 후, 액체질소를 부어 마쇄하였다. CTAB 추출 용액(2.5 M NaCl, 0.25M EDTA (pH 8.0), 0.5M Tris-Hcl (pH 8.0), 1% polyvinylpyrrolidone-10, 1% hexadecyl trimethyl ammonium bromide, 0.5% sodium dodesyl sulfate)을 첨가하여 65°C에서 1시간 처리한 후, 13,000 g로 10분간 원심분리하여 상정액만을 회수하였다. 상정액에 phenol/chloroform/IAA(v:v:v, 25:24:1) 혼합액을 처리하고 13,000 g로 15분간 원심분리하여 침전된 DNA를 회수하였다. 침전된 DNA는 70% ethanol을 첨가하여 13,000 g로 15분간 원심분리하여 세척한 후, 건조시켜 ethanol을 제거하였다. DNA는 멸균증류수로 용해시켜 -20°C에서 보관하며 PCR 실험에 사용하였다.

탄저병균의 진단과 동정을 위해서는 Ca1-1(CCA GGG GAA GCC TCT CGC GGG CCT)와 CgInt(GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG)라는 종 특이적인 primer와 universal primer로 ITS4(TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC)를 쌍으로 각각 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 4분간 pre-denaturation을 실시하였고, denaturation, annealing, elongation 단계를 94°C에서 30초, 65°C에서 30초, 72°C에서 1분간을 30회 반복하였다. 마지막 elongation 단계는 72°C에서 7분간 실시하였다. PCR 산물은 2% agarose gel을 이용하여 100V에서 60분간 전기영동하여 확인하였다.

결 과

서로 다른 배지 상에서의 *Colletotrichum* spp.의 생육. *C. gloeosporioides* KACC40690은 다른 *Colletotrichum* 종의 병원균들보다 PDA상에서의 생육이 가장 빨랐으며, PDA 배지에 다른 항생물질이나 살균제를 첨가하였을 때 생육이 가장 크게 억제되었다(Table 1). 배지에 carbendazim과 diethofencarb를 첨가하였을 때는 *C. gloeosporioides* KACC40690과 *C. dematium*은 전혀 생육할 수 없었지만, *C. acutatum* JC24와 *C. coccodes* KACC40010은 무처리에 비하여 생육은 억제되지만, 제한적으로 생육이 가능하였다.

고추 열매와 토양에서의 병원균 조사. Fig. 1에서 보는 것과 같이 포장에서 채집한 이병 고추에서는 반선택 배지의 종류에 따라서 균총의 크기는 다르지만 회색의 *C. acutatum*의 전형적인 균총이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 병원균을 접종하여 열매 당 5~25%의 병 발생을 보이는 고추에서 병원균을 분리하였다. Ampicillin과 tetracycline을 첨가하지 않았던 A 배지에서는 *C. acutatum*과 다양한 세균이 함께 성장하기 때문에 *C. acutatum*의 수를 조사하는데 어려움이 있었다. 발병 정도가 다른 고추에서 분리된 *C. acutatum*의 수는 발병 정도와 비례하며 증가하였다(Table 2). 열매의 25% 이상 발병된 고추에서는 C 배지에서 1.6×10^6 CFU/생체중 1 g의 균총이 나타났다. 발병의 정도가 낮아짐에 따라서 나타나는 균총의 수도 감소하였으며, 5% 미만의 발병 정도를 보였던 고추 열매에서는 1.0×10^4 CFU/생체중 1 g의 균총이 나타났다.

2004년 2월 중에 고추 재배 포장에서 채집한 고추의 이병 잔재물과 토양에서도 C 배지 상에서 *C. acutatum*을 분리할 수 있었다. Table 3에서 보는 바와 같이 이병 잔재물에서는 6.0×10^4 CFU/생체중 1 g의 균총을 확인하였

Table 1. Mycelial growth of *Colletotrichum* spp. on several media

Isolates	Media ^a				
	I	II	III	IV	V
<i>Colletotrichn acutatum</i> JC24	39.9 ^b	31.3	9.1	17.2	7.2
<i>C. coccodes</i> KACC40010	34.3	30.4	14.4	29.2	13.2
<i>C. gloeosporioides</i> KACC40690	56.5	44.5	0	19.2	0
<i>C. dematium</i>	24.7	26.4	0	21.7	0

^aMycelial growth of each pathogen was investigated on 5 kinds of media: I, PDA; II, PDA amended with 100 µg/ml of ampicillin and tetracycline; III, Medium II amended with 100 µg/ml of the mixture carbendazim and diethofencarb; IV, Medium II with 100 µg/ml of iprodione; V, Medium III amended with 100 µg/ml of iprodione.

^bColony diameter (mm) on PDA was measured after incubation of each *Colletotrichum* sp. for 5 days at 25°C.

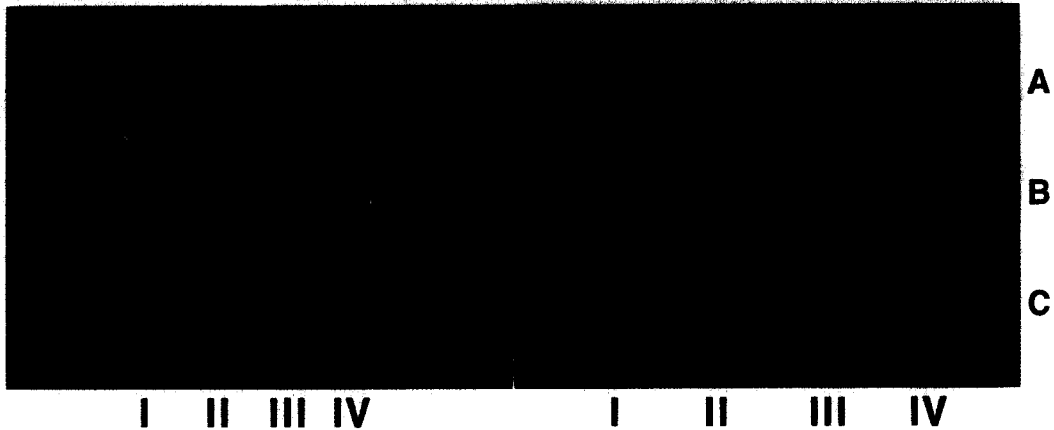


Fig. 1. Pepper fruits infected by *Colletotrichum acutatum* (left), which were evaluated by different disease severity, and colonies appeared on semi-selective media by flooding suspension of each pepper fruits. Pepper fruits were evaluated as follows; **I**, no symptom; **II**, below 5% of disease severity; **III**, showing disease severity between 5% and 25%; **IV**, above 25% of disease severity. In this experiment 3 kinds of media were used; **A**, PDA; **B**, PDA included with 100 µg/ml of ampicillin and tetracycline; **C**, PDA included 100 µg/ml of mixture both carbendazim and diethofencarb as well as 100 µg/ml of ampicillin and tetracycline. The colony number on semi-selective media was measured 7 days after flooding the suspension of infected pepper fruits.

Table 2. Number of *Colletotrichum acutatum* CFU^a recovered from pepper fruits infected by *C. acutatum*, and showing typical lesion

	Infected pepper fruits ^b			
	I	II	III	IV
CFU/g fresh weight	0	1.0 × 10 ⁴	3.3 × 10 ⁵	1.6 × 10 ⁶

^aThe CFU was abbreviated from colony forming unit.
^bInfected pepper fruits were classified with 4 types in accordance with disease severity on fruit, as follows; I, no symptom; II, at least 5% of disease severity; III, showing disease severity between 5% and 25%; IV, above 25% of disease severity.

고, 토양에서는 2.5×10 CFU/토양 1 g의 균총이 나타났다.
병원균의 확인. 고추를 재배했던 포장의 이병 잔재물

Table 3. Number of *Colletotrichum acutatum* CFU recovered from plant debris and soil on semi-selective media^a

	Soil	Plant debris
CFU ^b /g weight	2.5 × 10	6.0 × 10 ⁴

^aSemi-selective media was composed as follows; PDA, 100 µg/ml of ampicillin and tetracycline 100 µg/ml of mixture both carbendazim and diethofencarb, and 100 µg/ml of iprodione.
^bThe colony number was measured 7 days after flooding the suspension of plant debris, and soil from pepper field.

과 토양을 위에서도 동일한 방법으로 처리하여 반선택배지에 도말하였다. Fig. 1에서처럼 많은 균총이 형성되었는데, 형성된 균주가 *C. acutatum*인지의 여부를 확인할

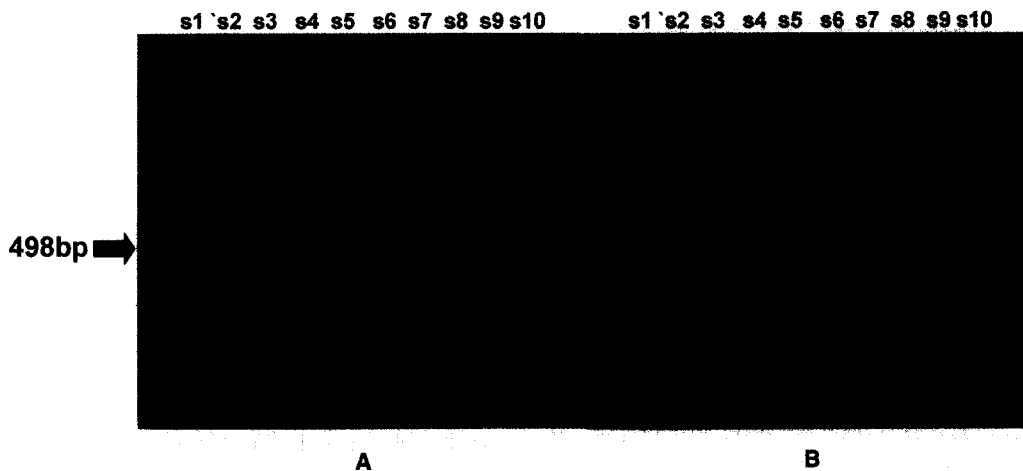


Fig. 2. PCR products and DNA size markers in agarose gel stained with ethidium bromide for ITS ribosomal DNA primers **A**, Cal-1 specific for *Colletotrichum acutatum*; **B**, CgInt specific for *C. gloeosporioides*. Ten isolates of s1 to s10 were selected randomly from colonies appeared on semi-selective media, where suspensions of plant debris and soil from pepper field were flooded.

필요가 생겼다. 반선택배지 상에서 형성된 균총 중에서 무작위로 10개를 선발하여 새로운 배지로 옮겨 배양한 후, 균사로부터 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 template로 사용하고 *C. acutatum*의 특이적인 primer를 이용하여 ITS영역의 특정부분을 증폭한 결과, Fig. 2에서처럼 선발한 모든 균주는 *C. acutatum*에 대하여 특이적인 primer에 의해서만 증폭되는, 약 498 bp의 산물을 확인할 수 있었다.

고 찰

고추 탄저병은 국내 고추 재배지역에서 고추의 생산량을 감소시키는 중요한 요인으로 작용하고 있다(Park과 Kim, 1992). 특히 고추 탄저병균은 주로 열매를 침입하기 때문에 고추의 수량과 품질의 저하에 큰 피해를 주고 있다. 국내에서 보고된 고추 탄저병균으로는 *C. gloeosporioides*, *G. cingulata*, *C. coccodes*, *C. dematium*, *C. acutatum* 등이 보고되어 있으며, 가장 중요한 병원균으로 *C. gloeosporioides*를 들고 있다(Park과 Kim, 1992). 임과 이(2004)도 고추의 주된 탄저병균을 *C. gloeosporioides*로 보고하였으며, *C. gloeosporioides*를 동정하는데는 병원균의 형태적인 특성을 기준으로 사용하였다. 그러나 Kim 등(2003)은 최근 전국적으로 고추 탄저병균을 채집하여 모니터링한 결과, 주된 탄저병균 집단이 *C. acutatum*이라고 보고하였다. 또한 AFLP 방법을 통하여 *C. acutatum*의 DNA의 다양성을 조사하여 보면 고추에서 분리한 *C. acutatum*의 사이에는 큰 다양성을 보이지 않고 매우 동질의 형질을 보이고 있었다(김과 김, 2004). *C. acutatum*과 *C. gloeosporioides*를 형태적인 특성을 비교하여 볼 때, PDA 배지에서의 균총의 색깔, 균사의 생장 속도 등에 차이를 보이고, 분생포자의 장경에는 미묘한 차이가 있을 뿐이다. *C. gloeosporioides*와 *C. acutatum*을 구별하는 중요한 기준은 두 종이 갖는 분생포자의 형태로서, *C. acutatum*의 분생포자는 *C. gloeosporioides*와 다르게 포자의 끝이 뾰족한 특징을 가지고 있다고 보고하였다(Sutton, 1980). 하지만 최근 *Colletotrichum*속 병원균을 형태학적으로 동정하는 방법이 한계를 보임으로써 두 종의 *Colletotrichum*에 대한 분류와 동정에는 분자생물학적인 방법과 살균제에 대한 반응, 균사의 생장 등이 많이 사용되고 있다(Freeman 등, 1993, 1996; Brooker 등, 1991; Hodson 등, 1993; Johnston과 Jones, 1997; Corell 등, 1993; Alahakoon 등, 1994). Adaskaveg와 Forster(2000)는 분생포자의 형태 이외에 생장 속도, 생장 적온, benomyl에 대한 반응 그리고 종 특이적 primer를 이용한 PCR 등을 사용하여 *C. gloeosporioides*와 *C. acutatum*을 구별하였다. 특히 본 실험

결과에서도 나타난 것과 같이 *C. acutatum*이 benzimidazole계 살균제에 대하여 저항성을 보이는 것은 이미 여러 연구자들에 의해서도 보고되어 있다(Liyanage 등, 1992; Bernstein 등, 1995; Ishii 등, 1998). Ishii 등(1998)에 의하면 *C. acutatum*은 benzimidazole계 살균제에 대하여 저항성을 보일 뿐만 아니라, benzimidazole계 살균제와는 역상관 교차 저항성을 보인다고 보고된 *N-phenylcarbamate*계 살균제에 대해서도 저항성을 보인다고 보고하였다. 하지만 *C. gloeosporioides*의 경우는 benzimidazole계 살균제에 대하여 저항성과 감수성 반응을 보이는 균주가 뚜렷하게 구별되어지고, *N-phenylcarbamate*계 살균제에 대해서도 확실한 역상관 교차 저항성 반응을 보여 주었다. 이와 같이 *C. acutatum*의 benzimidazole계 살균제에 대한 저항성 반응은 반선택성 배지를 만드는데 사용될 수 있다. Norman과 Strandberg(1997)는 leatherleaf fern의 주요 병원균인 *C. acutatum*이 토양과 식물의 잔재물에서 어느 정도 생존할 수 있는지를 조사하기 위하여 PDA 배지에 benomyl을 첨가하여 반선택배지로 사용하였다. 그러나 benomyl에 대하여 저항성을 나타내는 *C. gloeosporioides*이 토양이나 식물체의 잔재물에 존재한다면 benomyl을 첨가한 반선택 배지에서 생존이 가능하기 때문에 *C. acutatum*만의 생존을 조사가 불가능할 것으로 생각한다. 따라서 본 실험에서는 carbendazim과 diethofencarb의 혼합 살균제를 배지에 첨가함으로써 *C. acutatum*만을 좀 더 선택적으로 선발할 수 있는 반선택 배지를 확립할 수 있었다. 그러나 Table 1에서도 보는 바와 같이 *C. coccodes* KACC40010과 같은 균주도 *C. acutatum* JC24와 동일한 살균제 감수성을 보여줌으로써 반선택 배지에서 *C. acutatum*만을 선택적으로 조사할 수 없다는 것을 보여 주고 있다. 고추 포장에서의 *C. coccodes*의 밀도가 아주 낮기 때문에 오염되어 나타날 수 있을 확률도 낮을 것으로 생각하지만, 실제 실험을 수행하기 위해서는 토양이나 이병 잔재물에서 *C. acutatum*의 밀도를 조사하는 과정 중에서 나타날 수 있는 *C. coccodes*의 오염에 대하여 주의해야 한다. *C. coccodes*는 균핵을 형성하는 것으로 보고되어 있고, *C. acutatum* 종 특이적인 primer에 대하여 반응하지 않기 때문에 무작위적인 균주 선발을 통하여 두 균을 분류함으로써 반선택 배지의 효율을 상승시킬 수밖에 없다고 생각한다. 본 실험에서는 실험 중에 반선택 배지 상에 형성된 균총을 임의로 10개 선발하여 종 특이적 primer인 Ca1-1과 CgInt와 ITS4를 사용하여 PCR을 수행한 결과, Fig. 2에서와 같이 모두 *C. acutatum*에 대한 특이적 primer에 대해서만 반응을 나타냄으로써, 반선택 배지 상에서 나타난 균총의 대부분은 *C. acutatum*임을 알 수 있었다.

Table 3에서 보여주는 것처럼 반선택성 배지에 나타난 *C. acutatum*의 CFU는 토양보다는 이병 식물의 잔재물에서 더 많이 나타났다. 결국 *C. acutatum*은 포장에서 토양과 이병 잔재물 모두에서 월동하고 생존할 수 있으나, 토양보다는 이병 잔재물에서 월동하는 수가 30배 정도 높음을 보여 주고 있다. 따라서 고추 탄저병의 방제를 위해서 초기 전염원의 밀도를 줄이기 위해서는 포장에서 이병 식물의 잔재물을 제거하는 매우 중요하다는 것을 알 수 있다.

이상과 같이 고추 탄저병균의 주요 병원균인 *C. acutatum*의 선택적인 분리와 포장에서의 밀도를 정량화하기 위해서는 본 실험에서 확립한 반선택 배지가 효율적으로 사용될 수 있음을 확인하였다.

요 약

고추 탄저병균인 *Colletotrichum acutatum*은 100 µg/ml의 ampicillin과 tetracycline과 같은 항생물질과 100 µg/ml의 carbendazim과 diethofencarb의 혼합제를 첨가한 PDA 배지에서 특이적으로 성장하였다. 탄저병의 발병 정도가 다른 고추 열매를 갈아서 *C. acutatum*의 반선택 배지에 도말한 결과, 발병 정도와 반선택 배지에 나타나는 병원균의 균총 수는 정의 상관 관계를 나타냈다. 고추를 재배했던 포장에서 이병 잔재물과 토양을 채집하여 반선택 배지 상에서 병원균의 수를 조사한 결과, *C. acutatum*은 토양보다는 이병 잔재물에서 더 많은 수가 검출되었다. 반선택 배지에 나타난 병원균을 무작위로 10균주를 선발하여 동정하였다. 선발한 균주들의 DNA를 추출하여 *C. acutatum* 특이적인 primer를 사용한 PCR을 수행한 결과, 모든 균주가 *C. acutatum*으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구 결과는 농림기술센터(연구과제 번호 : 20020595)와 한국과학재단(연구과제 번호 : R01-2003-000-10898-0)의 연구비 지원으로 수행된 것으로 감사를 표합니다.

참고문헌

- Adaskaveg, J. E. and Forster, H. 2000. Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. p317-336. In: D. Prusky, S. Freeman, and M. B. Dickman (eds) *Colletotrichum*. St Paul, Minnesota, USA.
- Alahakoon, P. W., Brown, A. E. and Sreenivasaprasad, S. 1994. Cross-infection potential of genetic groups of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruits. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 44: 93-103.
- Bernstein, B., Zehr, E. I., Dean, R. A. and Shabi, E. 1995. Characteristic's of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. *Plant Dis.* 79: 478-482.
- Brooker, A. E., Sreenivasaprasad, S. and Timmer, L. W. 1991. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86: 523-527.
- Correll, J. C., Rhoads, D. D. and Guerber, J. C. 1993. Examination of mitochondrial DNA Restriction fragment length polymorphisms, DNA fingerprints, and randomly amplified polymorphic DNA of *Colletotrichum orbiculare*. *Phytopathology* 83: 1199-1204.
- De Cel, A., Martinez-Treceno, A., Salto, T., Lopez-Aranda, J. M. and Melgarejo, P. 2005. Effect of chemical fumigation on soil fungal communities in Spanish strawberry nurseries. *Appl. Soil Ecol.* 28: 47-56.
- Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E. 1996. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1014-1020.
- Freeman, S., Katan, T. and Shab, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Dis.* 82: 596-605.
- Freeman, S., Pham, M. and Rodriguez, R. J. 1993. Molecular genotyping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primed PCR, A+T-rich DNA, and nuclear DNA analyses. *Exp. Mycol.* 17: 309-322.
- Hodson, A., Mills, P. R. and brown, A. E. 1993. Ribosomal and mitochondrial DNA polymorphisms in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *Mycol. Res.* 97: 329-335.
- Ishii, H., Iwamoto, S., Nishimura, K. and Fukaya, M. 1998. Comparative studies on fungicide sensitivity and other characteristics in *Colletotrichum* isolated from various plant species. p. 529-534 Brighton crop protection conference Pests & Diseases- 1998 Vol.
- Johnston, P. R. and Jones, D. 1997. Relationship among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* 89: 420-430.
- Kim, C. H. and Park, K. S. 1988. A predictive model of disease progression of red-pepper anthracnose. *Kor. J. Plant Pathol.* 4: 325-331.
- Kim, J. T., Park, S. K., Choi, W. B., Lee, Y. H. and Kim, H. T. 2003. Identification of *Colletotrichum* spp. associated with pepper anthracnose in Korea. (abst.) *Plant Pathol. J.* 19: 331.
- Ko, W. H., Wang, I. T. and Ann, P. J. 2005. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biol. Biochem.* 37: 597-599.
- Liyanae, H. D., R. T. McMillan, Jr., and Kistler, H. C. 1992. Two

- genetically distinct population of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology* 82: 1371-1376.
- Massart, S., De Clercq, D. Salmon, M., Dickburt, C. and Jijakli, M. H. 2005. Development of real-time PCR using minor groove binding probe to monitor the biological control agent *Candida oleophila* (strain O). *J. Microbiol. Methods*. 60: 73-82.
- Norman, D. J. and Strandberg, J. O. 1997. Survival of *Colletotrichum acutatum* in soil and plant debris of leatherleaf fern. *Plant Dis*. 81: 1177-1180.
- Park, K. S. and Kim, C. H. 1992. Identification, distribution and etiological characteristics of anthracnose fungi of red pepper in Korea. *Kor. J. Plant Pathol.* 8 :61-69.
- Shin, H. J., Chen, Z. J., Hwang, J. M. and Lee, S. G. 1999. Comparison of pepper anthracnose pathogen from Korea and China. *Plant Patho. J.* 15: 323-329.
- Sutton, B. C. 1980. *Colletotrichum*. p523-536. in *The Coelomycetes* ed. by Sutton, B. C. pp696.
- Viljeon, B. C., Knox, A., Beuchat, L. B., Daek, T., Malfeito-Ferreira, M., Hansen, T. K., Hugo, A., Jakobsen, M., Loureiro, V., Lourens-Hattingh, A. and Vasdinyei, R. 2004. An inter-laboratory evaluation of selective media for the detection and enumeration of yeasts from blue-veined cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 9-14.
- 김홍태, 김윤식. 2004. 우리나라 주요 고추 탄저병균의 변화. p181-206. 한국 고추의 분자유전과 육종. pp522.
- 임진현, 이순구. 2004. 고추 탄저병균의 배양형 변이 그리고 병 원성 차이. 식물병연구. 10: 203-208.