

젯빛곰팡이병에 대한 순무잎의 반응과 Glucosinolate 함량변화

권순태^{1*}, Daniel J. Kliebenstein²

¹안동대학교 원예육종학과, ²UC-Davis 식물학과

Response of Turnip to *Botrytis cinerea* Infection and Their Relationship with Glucosinolate Profiles

Soon-Tae Kwon^{1*} and Daniel J. Kliebenstein²

¹Department of Horticulture and Breeding, Andong National University, Andong 760-749, Korea

²Department of Plant Science, University of California, Davis, CA 95616, USA

Abstract - In order to determine the response of turnip leaves to various races of *Botrytis cinerea*, fourteen different races were infected to the leaf surface and measured the lesion size. Based on lesion size of the pathogen on the leaves, turnip showed susceptible response to four races, moderate to seven races and resistant to three races. Four glucosinolate (GLS) compounds, such as butenyl GLS, indole-3ylmethyl GLS (I3M), 4-methoxy-indole-3-ylmethyl GLS (4MOI3M) and normal methoxy-indole-3ylmethyl GLS (NMOI3M) were identified in turnip leaves infected with *Botrytis cinerea*. Leaves infected with resistant races showed higher GLS contents as compared with the leaves infected with susceptible races. Contents of I3M in the leaves with resistant races were 2.5 times as high as those in uninfected leaves, whereas I3M in the leaves with susceptible races showed lower contents than those in untreated leaves. Leaves infected with resistant races showed 4MOI3M and NMOI3M contents 2.3 and 2.7 times as high as those in uninfected leaves, respectively. GLSs in the infected leaves were most abundant at 5 ~ 10 mm area from center of the lesion. However, the GLSs in 5 ~ 10 mm area were rapidly degraded at leaves with susceptible races which resulted in continuous expansion of the lesion on the leaves, whereas no degradation was observed at leaves with resistant races. These results suggest that accumulation and degradation of GLS compounds in turnip leaves closely related to the susceptibility and resistance of turnip leaves to *Botrytis* races.

Key words - Turnip, *Botrytis cinerea*, Glucosinolate, Phytoalexin, Defense

서 언

젯빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*)은 회색미병(gray mold disease)이라고도 불리며, 병원균은 불완전균의 일종으로 기주범위가 광범위하고 포자형성이 왕성하여 채소, 전작, 화훼, 과채류, 과수 등 어느 종류의 식물이라도 병을 일으킨다고 해도 과언이 아니다(Denby *et al.*, 2004; Rowe and Kliebenstein, 2008). 이 병은 처음에는 작은 수침상의 반점이 생기나 병반이 급격히 확대되면서 표면에 수많은 곰팡이 가루가 쥐털같은 모양으로 밀생하며 일단 병이 발생하면 식물체에 치명적인 해를 유발하는 것으로 알려져 있다(Rowe and Kliebenstein, 2007; Yu and Sutton,

1997).

Glucosinolate (GLS)는 질소와 황이 함유된 식물의 이차대사산물로 배추과를 포함한 *Brassica*속 식물에서 수십종이 밝혀져 있으며, 이 물질은 작물의 독특한 맛과 향을 결정할 뿐만 아니라 생체내에서 다양한 종류의 기능성을 발휘하는 것으로 알려져 있다(Pedras *et al.*, 2011; Pedras and Kliebenstein, 2008). GLS에 속한 물질은 측쇄의 형태에 따라 크게 aliphatic, benzyl 및 idole 형으로 구분되며 이들은 각각 다른 종류의 아미노산으로부터 생합성되어 지는 것으로 알려져 있다(Hansen *et al.*, 2008; Pedras, 2011; Glivetić *et al.*, 2008; Kliebenstein, 2001). 현재까지 알려진 GLS의 기능은 식물체의 병해충저항성, 종자 내 발아억제활성, 천연살균제 등의 활성이 보고되었으며, 영양

*교신저자(E-mail) : skwon@andong.ac.kr

학적으로는 항암작용, 항세균 및 항산화 활성이 확인되었다 (Glivetić *et al.*, 2008; Fenwick, 2008; Angelini, 1998). 한편 *Brassica*속 식물에 함유된 GLS중 일부 화합물은 가축이 섭취할 경우 고창증을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Barth and Jander, 2006; Hansen, 2008; Mithen, 1992).

GLS에 속한 상당수의 화합물은 자외선이나 화학물질과 같은 비생물적 스트레스뿐만 아니라 병균의 침입과 같은 생물적 스트레스에 의해서 자동적으로 유도되며, 이들 물질은 식물이 불량한 외부환경에 저항하는데 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Pedras *et al.*, 2011; Rowe and Kliebenstein, 2008). 순무(*Brassica rapa*)에서 밝혀진 GLS 중 1-methoxybrassinin 나 4-methoxycyclobraassinin 등은 식물이 정상상태에 있을 때는 최소한의 양으로 존재하다가 병원균에 감염되면 함량이 급격하게 증가하여 강한 항균작용을 발휘하는 것으로 알려져 있다 (Pedras *et al.*, 2011; Magrath *et al.*, 1994)

본 연구는 순무와 같이 *Brassica*속 식물에 감염되면 치명적인 해를 유발하는 잣빛곰팡이병의 다양한 균주를 이용하여, 각 균주에 대하여 잎이 나타내는 저항성과 감수성 정도에 따른 GLS 함량의 변화를 조사하여 순무의 잣빛곰팡이병 감염에 대한 GLS의 생합성 특징을 구명하고자 수행되었다.

재료 및 방법

균주배양 및 포자 준비

본 실험에 사용된 모든 잣빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*)의 균주는 캘리포니아주립대학교(UC-Davis)의 식물학과에서 보관 중인 것을 사용하였으며 균주의 접종과 배양, 병반의 조사, 시료채취 등은 현지에서 수행하였다. 순무(*Brassica nap*)는 국내시판중인 강화순무(주, 한국원예종묘)를 구입하여 사용하였다. 잣빛곰팡이병 균주를 배양하기 위해 1 cm 크기로 자른 복숭아네틱타 큐빅을 30 mm petridish에 넣고 각 큐빅에 균주를 접종하여 상온에서 1주일간 배양하였다 (Rowe and Kliebenstein, 2008). 균주에서 포자를 채취하기 위해 접종 후 1주가 지난 petridish에 5 ml의 멸균 증류수를 가하여 5분간 좌우로 흔든 후 포자가 섞인 증류수를 15 ml Falcon 튜브에 수집하였다. 수집한 포자의 수를 조사하기 위해 hemocytometer에 포자액을 가하여 400배율의 현미경으로 관찰하여 계산하였으며, 1,200 rpm으로 원심분리한 후 상등액은 완전히 제거하고 가라앉은 포자를 1 ml당 10개의 포자가 함유되도록 포도주스로 희석하여 접종용으로 사용하였다 (Rowe and Kliebenstein, 2007).

접종 및 병반조사

순무씨앗을 직경 5 cm인 화분에 한 개씩 파종하고 수분을 흡수시켜 4°C에서 3일간 저온처리를 한 후 온도 25 ± 1°C, 광 16시간이 유지되는 생장실에서 10일간 생장시켰다. 2개의 잎이 완전히 전개된 실생묘로부터 제1엽만을 채취하여, 1.2% 한천 블록위에 잎의 표면이 위로 향하도록하고, 포도주스로 희석된 포자액을 4 ml씩을 잎 표면에 접종하였다. 잣빛곰팡이병이 접종된 순무잎의 수분 유지를 위해 한천블록과 잎을 뚜껑으로 봉하였으며 상온에서 24시간 광 상태를 유지하였다. 병반의 관찰을 위해 접종 후 매 12시간 간격으로 잎의 사진을 찍어 병반의 직경을 측정하였다 (Denby *et al.*, 2004; Rowe and Kliebenstein, 2008). 잎의 표면에서 잣빛곰팡이균이 정상적으로 균사를 형성하는지를 알아보기 위해 trypan blue로 염색을 실시하였다. 접종 후 12시간 된 잎을 lacto phenol-용액(10 ml lactic acid, 10 ml glycerol, 10 ml liquid phenol, 10 ml DH₂O, 10 mg trypan blue)에 넣고 1분간 끓여서 염색한 후, 탈색을 위해 chloral hydrate 용액(2.5g in 1 ml DH₂O)으로 24시간 담근 후 70% glycerol 용액으로 수차례 세척하여 현미경 카메라를 이용하여 병반주위에 형성된 균사를 촬영하였다 (Rate *et al.*, 1999).

GLS 함량측정

잣빛곰팡이병을 순무잎에 접종한 후 매 12시간 간격으로 GLS 함량 측정을 위해 시료를 채취하였다. 잣빛곰팡이병의 병반이 자라는 순무잎에 직경이 10 mm 되는 원형천공기로 잎 시료를 채취하여 액체질소에 담근 후 냉동건조하여 시료무게를 측정하였다. 잎 절편 6개 분량의 건조시료를 96-well plate에 넣은 후 90% MeOH 400 µl를 첨가하여 완전히 마쇄하고, 3,200 rpm에서 원심분리 후 상등액을 취하였다. 상등액 150 µl를 Sephadex (DEAE A-25)가 충전된 96-well plate에 통과시킨 후, 90% MeOH와 증류수를 각각 150 µl씩 차례로 통과시켜 세척한 후 1/10로 희석한 sulfatase 150 µl 용액에 24시간 정치한 후 1,200 rpm으로 원심분리하여 통과한 용액을 HPLC 분석용으로 하였다 (Kliebenstein *et al.*, 2001). GLS의 정량분석은 HPLC (Hewlett-Packard, Lichrocart 250-4 RP18e 5 µm column)를 이용하였으며, 분석조건은 Kliebenstein *et al.* (2001)의 방법에 따라 acetonitrile의 농도구배를 5~7%에 2분, 7~25%에 7분, 25~92%에 2분, 92%에 6분, 92~1.5%에 1분, 1.5%에 5분간 처리하는 방식으로 시료를 column에 통과시켰다. 물질의 동정은 GLS 표준 물질을 HPLC로 분석하여 크로마토그램을 입력한 후 시료의 크로마토그램과 비교하는 방식으로 실시하였다.

결과 및 고찰

잎의 반응과 GLS 분석

Table 1은 14종의 잣빛곰팡이병 균주를 순무잎에 접종하여 48시간 후에 나타난 병반의 크기와 접종된 순무잎에서 확인된 4종의 GLS 함량을 나타낸 것이다. 처리한 균주별로 순무잎에 나타난 병반의 크기를 기준으로 잎의 반응을 보면, ‘사과-01’, ‘딸기’, ‘포도-01’, ‘고추’ 균주는 병반의 크기가 8 mm 이상으로 크게 나타나서 순무잎이 이들 균주에 대하여 감수성(S, susceptible)을 보이는 것으로 분류하였으며, ‘아카시아’, ‘사과-02’, ‘포도-02’, ‘포도-03’, ‘산딸기’, ‘토마토-01’, ‘토마토-02’ 균주는 병반의 크기가 5~8 mm 정도를 보여 순무잎이 이들 균주에 대한 반응이 보통(M, moderate)인 것으로 분류하였으며, ‘오렌지’, ‘포도-04’, ‘장미’ 균주는 각각 2.1, 2.4 및 1.7 mm로 다른 균주에 비하여 현저히 작아서 순무잎이 저항성(R, resistance)을 보이는 균주로 분류하였다(Table 1). 잣빛곰팡이병의 병반은 접종 후 12시간까지는 육안으로는 거의 관찰되지 않으나 24시간 이후

부터는 병반이 확대되는 모양이 뚜렷하게 나타나며, 균주의 종류별로 병반의 크기 차이가 명확하게 보이기 시작하였다. 균주를 접종한 후 잎의 표면에서 균사가 확대되는 모양을 trypan blue로 염색하여 관찰한 결과 균사가 식물잎 표면에서 정상적으로 자라고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

순무의 잎에서는 GLS의 기본구조에 붙은 측쇄의 종류에 따라 4종류의 각각 다른 GLS가 확인되었다. 측쇄가 aliphatic 그룹에 속하는 butenyl-glucosinolate (butenyl-GLS)와 3종류의 indole 그룹 GLS 즉, indol-3-ylmethyl GLS (I3M-GLS), 4-methoxy-indol-3-ylmethyl GLS (4MOI3M-GLS) 및 normal methoxy-indol-3-ylmethyl GLS (NMOI3M-GLS)가 동정되었다(Table 1, Fig. 2).

지방족 측쇄를 가진 butenyl-GLS의 함량은 무처리가 37.45 $\mu\text{Mg}^{-1}\text{DW}$ 를 보였고, 대조로 사용된 AgNO_3 처리에서 54.46 μMg^{-1} 를 보여 무처리보다 약 1.5배가 증가하였다. 그러나 잣빛곰팡이병 균주를 접종한 잎에서는 14개의 균주 모두에서 무처리보다 함량이 감소하였다. 특히 ‘사과-02’, ‘포도-01’, ‘토마토-02’ 균

Table 1. Lesion size, plant susceptibility and content of GLS in turnip leaves infected with *Botrytis cinerea*

Races of <i>B. cinerea</i>	Lesion size (mm)	Plant response ^z	Content of GLS ^y ($\mu\text{mole}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$)			
			Butenyl	I3M	4MOI3M	NMOI3M
Accacia	5.1 ± 0.40	M	26.72 ± 6.07	1.34 ± 0.23	0.38 ± 0.02	1.43 ± 0.11
Apple-01	8.1 ± 0.91	S	18.63 ± 3.14	0.32 ± 0.14	0.46 ± 0.02	1.03 ± 0.11
Apple-02	5.5 ± 0.50	M	15.51 ± 4.17	0.12 ± 0.02	0.45 ± 0.01	1.05 ± 0.12
Orange	2.1 ± 0.20	R	31.44 ± 4.32	3.21 ± 0.78	1.02 ± 0.13	3.87 ± 0.56
Strawberry	8.8 ± 1.04	S	18.25 ± 4.21	0.36 ± 0.03	0.45 ± 0.02	1.01 ± 0.04
Grape-01	10.3 ± 0.93	S	15.07 ± 3.11	0.11 ± 0.07	0.55 ± 0.01	1.05 ± 0.01
Grape-02	7.4 ± 0.75	M	20.87 ± 4.45	1.04 ± 0.78	0.17 ± 0.05	2.79 ± 0.32
Grape-03	6.1 ± 0.17	M	22.52 ± 5.61	0.95 ± 0.13	0.68 ± 0.02	1.71 ± 0.23
Grape-04	2.4 ± 0.53	R	24.01 ± 4.56	3.42 ± 1.02	2.08 ± 0.15	4.41 ± 1.34
Pepper	8.7 ± 0.46	S	20.29 ± 3.55	0.51 ± 0.06	0.61 ± 0.04	1.32 ± 0.43
Raspberry	5.0 ± 0.00	M	22.73 ± 5.71	2.31 ± 0.63	1.56 ± 0.25	2.55 ± 1.21
Rose	1.7 ± 0.29	R	23.52 ± 5.61	3.69 ± 0.34	1.16 ± 0.35	3.01 ± 0.78
Tomato-01	5.3 ± 0.58	M	29.22 ± 6.18	2.59 ± 0.69	0.67 ± 0.11	3.14 ± 0.98
Tomato-02	5.1 ± 0.11	M	16.81 ± 3.44	1.41 ± 0.98	0.41 ± 0.18	1.69 ± 0.23
AgNO_3	-	-	54.46 ± 5.76	2.05 ± 0.12	1.56 ± 0.21	4.02 ± 1.24
Control	-	-	37.45 ± 4.31	1.26 ± 0.07	0.89 ± 0.13	1.09 ± 0.19

^zPlant susceptibility to *B. cinerea* based on lesion size at 48 hours after inoculation. S: susceptible; M: moderate; R: resistance.

^yTypes of glucosinolates based on side groups : I3M : indol-3-ylmethyl glucosinolate, 4-MOI3M : 4-methoxy-I3M, NMOI3M : normal methoxy-I3M. 4 μl of isolated *B. cinerea* spores in grape juice (10 spores/ μl) were inoculate to 10 days old turnip leaves and incubated at room temperature with light illumination. All data is mean \pm SD of three replications.

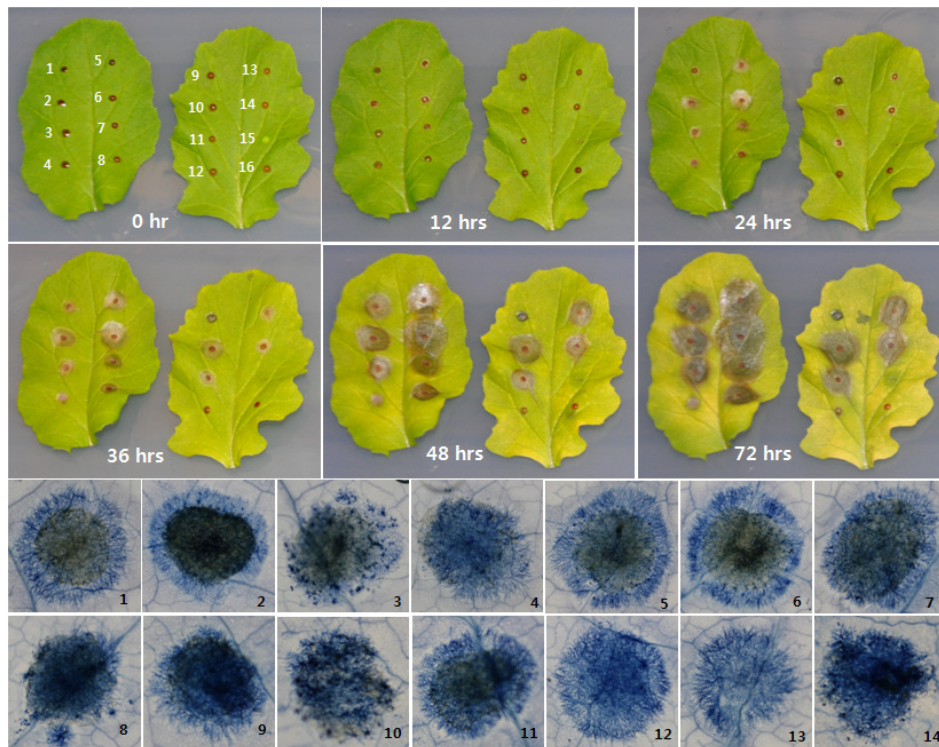


Fig. 1. Time course development of lesions (upper) and trypan-blue staining (lower) of various *Botrytis cinerea* races on turnip leaves. 4 μ l of isolated *B. cinerea* spores in grape juice (10 spores/ μ l) were inoculate to 10 days old turnip leaves and incubated at room temperature with light illumination. Strains of *B. cinerea* : 1. Accacia, 2. Apple-01, 3. Apple-02, 4. Orange, 5. Strawberry, 6. Grape-01, 7. Grape-02, 8. Grape-03, 9. Grape-04, 10. Pepper, 11. Raspberry, 12. Rose, 13. Tomato-01, 14. Tomato-02, 15. AgNO₃, 16. Control (grape juice only).

주를 접종한 잎에서 각각 15.51, 15.07 및 16.81 μ Mg⁻¹을 보여 처리한 균주 중 butenyl-GLS의 함량이 가장 낮았다. 저항성으로 분류된 ‘오렌지’, ‘포도-04’, ‘장미’ 균주를 접종한 잎의 butenyl-GLS 함량은 각각 31.44, 24.01 및 23.52 μ Mg⁻¹을 보였고, 감수성으로 분류된 ‘사과-01’, ‘딸기’, ‘포도-01’, ‘고추’ 균주를 접종한 잎에서는 각각 18.63, 18.25, 15.07 및 20.29 μ Mg⁻¹을 보여 잎이 감수성을 보인 균주보다 저항성인 균주를 접종한 잎에서 butenyl-GLS의 함량이 현저히 높은 경향을 보였다(Table 1).

Indole형 측쇄를 가진 I3M-GLS의 함량은 무처리보다 1.26 μ Mg⁻¹인데 비하여 잎이 저항성을 나타내었던 ‘오렌지’, ‘포도-04’ 및 ‘장미’ 균주를 접종한 잎에서는 각각 3.21, 3.42 및 3.69 μ Mg⁻¹를 보여 무처리보다 2.5배 이상 함량이 증가하였다. 그러나 잎이 감수성을 보인 ‘사과-01’, ‘딸기’, ‘포도-01’, ‘고추’ 균주를 접종한 잎에서는 각각 0.32, 0.36, 0.11 및 0.51 μ Mg⁻¹을 보여 무처리보다 이 물질의 함량이 감소한 것으로 나타났다(Table 1).

4MOI3M-GLS의 함량은 무처리에서 0.89 μ Mg⁻¹를 보였으나 저항성을 보인 균주인 ‘포도-04’를 접종한 잎에서는 2.08 μ Mg⁻¹

로 무처리에 비해서 약 2.3배의 증가하였다. 잎의 4MOI3M-GLS 함량은 저항성을 보인 균주를 접종한 잎에서는 모두 높게 나타났으나 감수성을 보인 균주를 접종한 잎에서는 모두 무처리보다 낮았다(Table 1).

NMOI3M-GLS의 함량은 무처리 잎에서는 1.09 μ Mg⁻¹을 보였으나 저항성을 보였던 ‘오렌지’, ‘포도-04’, ‘장미’ 균주를 접종한 잎에서는 각각 3.87, 4.41 및 3.01 μ Mg⁻¹을 보여 무처리에 비해서 현저하게 증가하였다. 그러나 감수성을 보였던 균주를 접종한 잎의 NMOI3M-GLS 함량은 무처리와 비슷하거나 줄어드는 경향을 보였다(Table 1).

AgNO₃를 처리한 잎에서는 모든 GLS가 무처리보다 함량이 높게 나타나, Kliebenstein *et al.* (2001)이 애기장대를 대상으로 실시연구와 일치하는 하는 경향을 보였다. AgNO₃는 본 실험에 처리한 잣빛곰팡이병과는 달리 비생물적인 요소로서, 잣빛곰팡이병 균주의 경우는 잎에서 병반을 확대해 가면서 식물세포와 지속적인 생물적 상호작용을 하지만, AgNO₃의 경우는 생물체인 균주와는 다른 기작으로 잎의 GLS 유도에 관여 하는 것

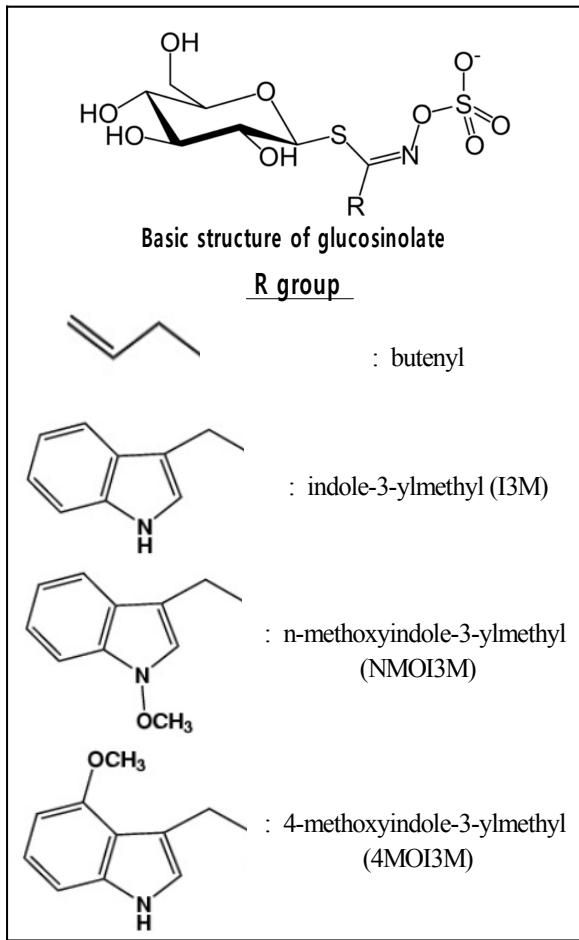


Fig. 2. Basic structure of glucosinolate and R group identified in the leaf of turnip.

으로 판단된다. 이 결과로 보면 갯빛곰팡이병을 접종한 순무의 잎에서 생합성되는 4종류의 GLS의 함량은 균주에 대한 잎의 감수성이나 저항성 정도에 따라 차이를 보이는 것을 볼 수 있다. 이는 GLS가 순무잎의 갯빛곰팡이병에 대한 저항성을 발휘하는데 중요한 역할을 하는 물질임을 강하게 시사하고 있다.

GLS는 *Brassica*속 식물에서 생합성되는 대표적인 phytoalexin으로 측쇄의 형태에 따라 백 여종이 존재하는 것으로 알려져 있다(Pedras *et al.*, 2011; Mithen, 1992). 이들 물질은 가축의 고창증, 인체의 항암, 항산화 작용과 같은 식이적 기능을 나타낼 뿐만 아니라, 식물체 내에서 여러 종류의 환경 스트레스에 반응하는 물질로도 알려져 있다. 특히 indole형 측쇄를 가진 GLS는 자외선이나 화학적 스트레스에 의해 생합성이 증가하며, 식물이 다양한 종류의 병원균에 감염되었을 때 스스로 생합성을 유도함으로써 식물의 항균작용에 결정적인 역할을 하는 물질로 알려져 있다(Pedras and Manillapalle, 2012; Rowe and Kliebenstein,

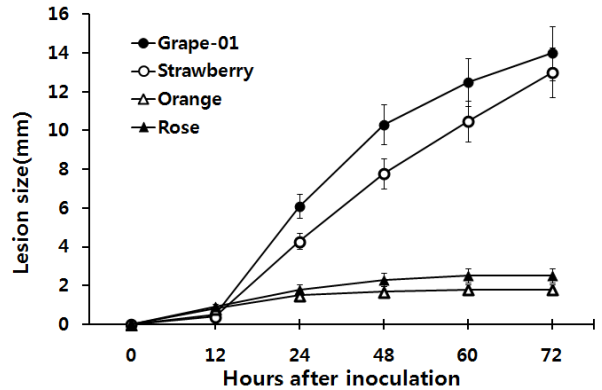


Fig. 3. Time course changes in the size of lesions on turnip leaves infected with various strains of *Botrytis cinerea*. 4 μ l of isolated *B. cinerea* spores in grape juice (10 spores/ μ l) were inoculate to 10 days old turnip leaves and incubated at room temperature with light illumination.

2007, 2008; Hansen *et al.*, 2008; Barth and Jander, 2006). 본 실험에서 갯빛곰팡이병균에 감염된 순무의 잎에서도 지방족 측쇄를 가진 GLS보다 indole형 측쇄를 가진 GLS가 식물의 감수성이나 저항성에 더 민감한 반응을 보이는 것으로 보아 indole형 측쇄를 가진 GLS는 순무잎이 갯빛곰팡이병균에 대해 저항성을 발휘하는데 중요한 역할을 할 것으로 사료 된다.

본 실험에 사용된 14개의 갯빛곰팡이병 균주 중 순무잎이 가장 뚜렷한 저항성을 보인 ‘오렌지’와 ‘장미’ 균주와 가장 뚜렷한 감수성을 보인 균주인 ‘포도-01’과 ‘딸기’ 균주를 선정하여 다음 단계의 실험을 수행하였다.

병반의 확대와 GLS의 함량변화

갯빛곰팡이병 균주 중에서 순무잎이 저항성을 보였던 ‘오렌지’ 및 ‘장미’ 균주와 감수성을 보였던 ‘포도-01’ 및 ‘딸기’ 균주를 접종하여, 접종 후 시간의 경과에 따른 병반의 크기 변화를 측정하였다(Fig. 1, Fig. 3). 4개의 균주 모두 접종 후 12시간까지는 거의 병반이 육안으로 관찰되지 않으나 24시간이 경과하면 순무잎의 감수성 정도에 따라 병반의 크기에 현저한 차이를 보이면서 감수성이 큰 균주일수록 크기의 증가가 뚜렷해지는 것을 볼 수 있었다. 순무잎이 저항성을 보인 ‘오렌지’와 ‘장미’ 균주는 병균을 접종한 후 24시간이 경과하면 병반의 크기가 거의 최대에 달하고 더 이상의 병반 확대가 관찰되지 않으나, 감수성을 보인 ‘포도-01’과 ‘딸기’ 균주는 시간이 경과하면서 병반이 지속적으로 커지다가 궁극적으로 잎 전면으로 퍼지는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1, Fig. 3).

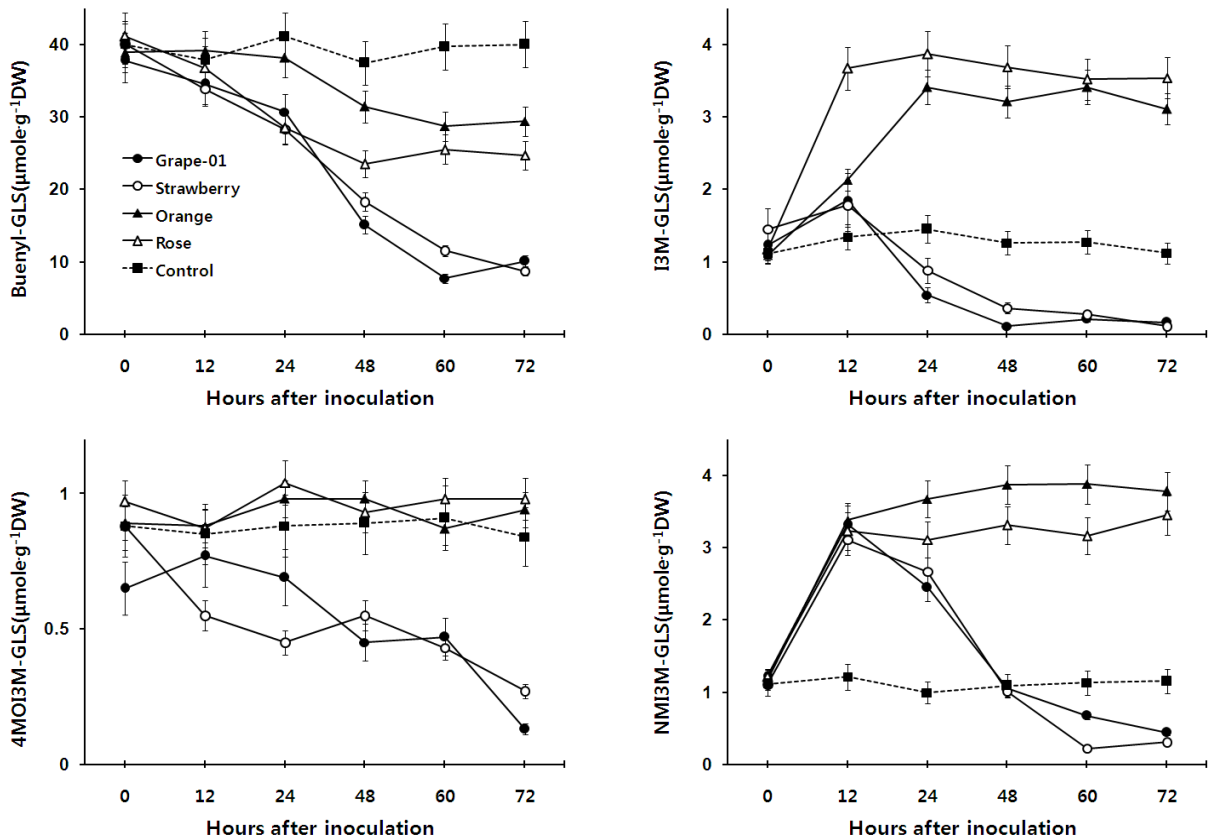


Fig. 4. Time course changes in various types of glucosinolates in turnip leaves infected with various strains of *Botrytis cinerea*. 4 μl of isolated *B. cinerea* spores in grape juice (10 spores/ μl) were inoculate to 10 days old turnip leaves and incubated at room temperature with light illumination.

병반이 확대되어 가는 과정과 병행하여 4개의 균주를 접종한 순무잎에서 일정한 시간별 4종류의 GLS 함량을 측정하였다. Butenyl-GLS는 무처리 잎의 경우는 함량에 유의한 변화는 없으나 4개 균주를 접종한 잎에서는 지속적으로 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 접종 후 72시간째에 조사한 butenyl-GLS 함량은 잎이 저항성을 보인 ‘오렌지’나 ‘장미’ 균주를 접종한 잎에서 각각 28.5 및 24.7 μMg^{-1} 를 보였으나, 감수성을 보인 균주인 ‘포도-01’나 ‘딸기’ 균주를 접종한 잎에서는 각각 11.1 및 9.8 μMg^{-1} 를 보였다. 즉, ‘오렌지’나 ‘장미’ 균주와 같이 순무잎이 저항성을 보이는 균주를 접종한 것이 감수성을 보이는 균주를 접종한 잎보다 시간의 경과에 따른 butenyl-GLS의 함량 감소가 현저히 적은 것으로 나타났다(Fig. 4).

I3M-GLS는 4개의 균주 모두 접종 후 12시간째에는 무처리보다 함량이 증가하였다. 그러나 잎이 감수성을 보인 ‘포도-01’과 ‘딸기’ 균주를 접종한 잎에서는 접종 후 12시간 이후부터 그 함량이 급격히 감소하였으나, 저항성을 보인 ‘오렌지’와 ‘장미’

균주를 접종한 잎에서는 접종 후 24시간까지도 그 함량이 증가하였고, 그 이후에도 지속적으로 증가된 함량이 유지 되는 것을 볼 수 있었다. 병반의 크기는 접종 후 12시간 까지는 순무 잎에서 육안 관찰이 거의 어려울 정도로 작게 나타났으나(Fig. 1, Fig. 3), 접종한 순무잎에 함유되어 있는 I3M-GLS 함량은 접종 12시간째에 이미 상당히 높은 수준을 유지하고 있음을 볼 수 있었다(Fig. 4).

한편 순무가 저항성을 나타내는 ‘오렌지’와 ‘장미’ 균주를 접종한 잎은 시간이 경과하더라도 높은 I3M-GLS 함량을 계속 유지하였으나, 순무가 감수성을 나타내는 ‘포도-01’과 ‘딸기’ 균주를 접종한 잎에서는 초기 12시간까지 증가된 I3M-GLS의 함량이 시간이 경과함에 따라 차츰 감소되는 것을 볼 수 있었다. 즉 순무가 감수성을 보이는 균주를 접종한 잎에서는 I3M-GLS의 불활성화가 지속되면서 병반은 계속적으로 확대되지만, 순무가 저항성을 나타내는 균주를 접종한 잎에서는 I3M-GLS 함량이 높게 유지되는 반면 병반의 확대는 더 이상 되지 않는 상관관

계를 보였다. 이 결과로 보아 젓빛곰팡이병에 대한 순무잎의 감수성과 저항성의 정도와 I3M-GLS 함량 간에는 상당한 연관이 있는 것으로 판단되며, I3M-GLS는 순무잎이 젓빛곰팡이병 균주에 대한 저항성을 나타내는 것과 관련이 있을 것으로 추정된다.

4MOI3M-GLS는 감수성인 ‘포도-01’과 ‘딸기’ 균주를 접종한 잎에서는 접종 후 시간이 경과함에 따라 현저한 감소를 보였으나 저항성인 오렌지와 장미균주를 접종한 잎에서는 무처리와 비슷하거나 높은 함량을 유지 하였다. 4MOI3M-GLS도 감수성 균주를 접종한 잎보다 저항성 균주를 접종한 잎에서 뚜렷하게 높은 함량을 보여 식물의 젓빛곰팡이병에 대한 반응과 높은 상관관계를 보이는 것으로 나타났다(Fig. 4).

NMOI3M-GLS도 접종 후 경과한 시간별 함량변화는 I3M-GLS와 유사한 경향을 보였다. 그러나 NMOI3M-GLS의 경우는 접종 후 12시간째에는 감수성이나 저항성을 보인 균주 모두가 무처리에 비해 3배 이상의 함량 증가를 보이나, 접종 12시간 이후부터는 시간이 경과함에 따라 감수성을 보인 ‘포도-01’과 ‘딸기’ 균주를 접종한 잎에서는 현저히 그 함량이 감소되지만 저항성을 보인 ‘오렌지’와 ‘장미’ 균주를 접종한 잎에서는 증가된 함량이 72시간 까지도 계속 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 4). 젓빛곰팡이병을 접종 한 후 순무잎에서 병반이 확대되는 정도와 잎에서 생합성된 NMOI3M-GLS의 함량 간에는 상당한 연관이 있는 것으로 보이며, NMOI3M-GLS도 순무잎이 젓빛곰팡이병 균주에 대한 저항성이나 감수성을 나타내는 것과 밀접한 관련이 있을 것으로 판단된다.

식물체내에서 GLS의 생합성과정은 아미노산 측쇄의 신장, GLS 골격구조의 형성, 측쇄의 변형과 생성과정을 거치게 되는데, GLS 골격구조는 aldoxime, thiohydroximate, desulfoglucosinolate 등과 같은 일련의 과정을 거치면서 두 개의 황이 함유된 물질로 만들어 진다(Hansen, 2008). 한편 생합성된 GLS는 myrosinase의 작용에 의해 nitriles, isothiocyanates, epithiocyanate, thiocyanate 등과 같은 화합물로 분해되는데, 이들 대사산물들이 해충 저항성, 항균작용, 식물독성, 고창증, 항암, 항산화 활성 등과 같은 다양한 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Kliebenstein *et al.*, 2001). 본 실험에서 순무잎에서 동정된 4가지 GLS 화합물들의 대사산물 중 구체적으로 어떠한 대사산물들이 젓빛곰팡이병에 대한 감수성이나 저항성에 관여하는지에 대해서는 단정 짓기 어렵다. 그러나 젓빛곰팡이병균 중 순무잎이 감수성을 보이는 균주가 감염되었을 때 보다 저항성을 보이는 균주가 감염되었을 때 더 높은 GLS 함량을 유지하거나 생합성 되는 것으로 보아 GLS의 함량은 순무잎의 젓빛곰팡이병 항균작용의 정도와

밀접한 연관이 있는 것으로 판단된다.

병반주위의 GLS 분포

순무잎이 저항성을 보인 ‘장미’ 균주와 감수성을 보인 ‘포도-01’ 균주를 택하여 잎에 나타난 젓빛곰팡이병 병반의 중심으로 부터 5 mm씩 멀어 지면서 잎 시료를 채취하여 접종 12시간 후와 24시간 후의 GLS 함량을 조사하였다(Fig. 5). 접종 12시간 후에 조사한 순무잎의 GLS함량을 보면, 저항성을 보인 장미나 감수성을 보인 포도-01 균주 모두 병반의 중심부(0~5 mm 부위)에서는 무처리의 약 20% 정도로 현저히 낮았으나 병반의 중심으로 부터 5~10 mm 사이에서는 무처리와 비슷하거나 현저히 증가 하는 것을 알 수 있었다. 특히 저항성인 ‘장미’ 균주를 접종한 12시간 후에는 병반의 중심으로부터 5~10 mm 떨어진 부위에 butenyl, I3M, 4MOI3M 및 NMOI3M이 무처리보다 각각 1.25, 2.71, 2.11 및 2.73배 증가하였다. 그러나 병반의 중심에서 10 mm 보다 먼 곳에서는 접종한 균주가 저항성이나 감수성에 관계없이 모든 GLS의 함량이 무처리와 비슷한 함량을 보였다(Fig. 5). 접종 후 24시간째 조사한 GLS 함량을 보면 저항성인 ‘장미’ 균주와 감수성인 ‘포도-01’ 균주 간에는 큰 차이를 보이는 것으로 나타났다.

‘포도-01’ 균주를 처리한 잎의 경우는 5~10 mm 부위에서 12시간째에는 비교적 높은 GLS함량을 보였으나 접종 24시간 후에 조사한 동일한 위치의 GLS 함량은 현저히 감소하여 무처리 잎의 50% 미만 수준을 보인 것으로 나타났다. 그러나 잎이 저항성을 보인 ‘장미’ 균주를 처리한 잎에서는 접종 12시간 후와 24시간 후의 GLS함량에 유의한 차이를 보이지 않았다. 이 결과로 보면 젓빛곰팡이병이 순무의 잎 표면에서 병반을 확장하기 위해서는 병반으로부터 5~10 mm 부위에 과다하게 생성되어있는 GLS를 분해를 해야 가능하다는 것을 알 수 있었다. 즉 감수성 균주인 ‘포도-01’ 균주를 처리 한 경우는 병반이 확대되어 가면서 기존에 생합성되었던 GLS가 파괴되면서 지속적인 병반의 확대가 이루어지지만 저항성을 보인 ‘장미’ 균주를 처리한 경우는 병반의 5~10 mm 주변에 생합성 되어 있는 GLS를 분해하지 못하여 병반의 확대가 더 이상 진전되지 않는 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합하면 순무잎의 젓빛곰팡이병에 대한 저항성은 순무잎에서 생합성되는 GLS의 함량과 밀접한 연관이 있는 것으로 추정되며 병반의 주위에 GLS 함량이 증가 할수록 순무잎은 젓빛곰팡이병의 균주에 대한 저항성을 나타내는 것으로 나타났다. 한편 병반이 이미 확산된 곳에는 GLS 함량이 현저히 떨어지게 되는데 이는 병반이 확산되면서 감염 초기에 형성되었던 GLS가 분해되는 것으로 추정된다. GLS가 식물이 젓빛곰팡

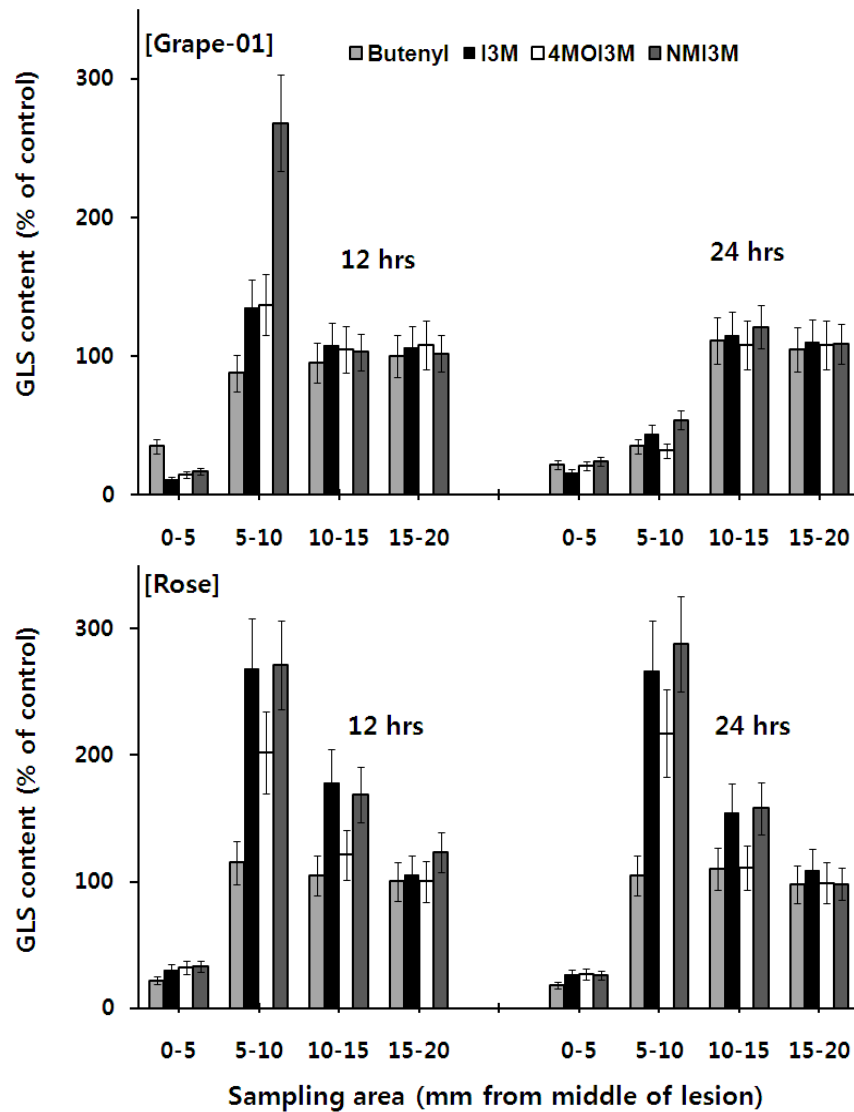


Fig. 5. Distribution of glucosinolates in turnip leaves infected with *Botrytis cinerea*, 'Grape-01' (upper) and 'Rose' (lower) race. 4μl of isolated *B. cinerea* spores in grape juice (10 spores/μl) were inoculate to 10 days old turnip leaves and incubated at room temperature with light illumination. GLS contents were measured at 12 and 24 hours after inoculation.

이병 대하여 저항성을 나타내는데 어떠한 기작으로 작용하는지를 파악하기 위해 잣빛곰팡이병을 처리한 순무잎으로부터 유도되는 관련 효소와 유전자 분석이 필요하다고 사료되며 금후 이들을 병저항성과 내성식물의 육성을 위한 자료로 활용코자 한다.

적 요

14종의 잣빛곰팡이병 균주를 순무의 잎에 접종시켜 병반의 확대 정도를 조사한 결과 순무잎은 '사과-01' 등 4종의 균주에 대해서는 감수성을, '아카시아' 등 7종에 대해서는 보통, '오렌지' 등

3종에 대해서는 저항성을 보였다. 순무잎에 함유된 glucosinolate (GLS)를 분석한 결과 butenyl-GLS, indol-3-ylmethyl GLS (I3M), 4-methoxy-indol-3-ylmethyl GLS (4MOI3M) 및 normal methoxy-indol-3-ylmethyl GLS (NMOI3M) 등 4종류가 동정되었다. 순무잎의 GLS 함량은 감수성을 보이는 균주에 감염되었을 때보다 저항성을 보이는 균주에 감염되었을 때 높게 유지되거나 분해가 지연되는 것으로 나타났다. 특히 I3M의 함량은 저항성인 균주에 감염되었을 때는 무처리보다 2.5배 이상 함량이 증가하였으나 감수성 균주에 감염되었을 때는 무처리보다 함량이 낮았다. 4MOI3M 및 NMOI3M의 함량도

저항성을 보인 균주에서 무처리에 비해서 각각 2.3 및 2.7배 이상의 증가를 보였다. 젓빛곰팡이병이 순무잎에 감염되면 병반의 중심으로부터 5~10 mm 부근에 GLS 함량이 현저하게 증가하였다. 그러나 저항성 균주를 처리한 곳에서는 GLS 함량이 계속 유지되면서 병반의 확대가 더 이상 진전되지 않으나, 감수성 균주를 처리한 앞에서는 기존에 합성되었던 GLS의 함량이 감소되면서 병반이 계속적으로 확대되어 갔다. 이는 GLS가 순무잎의 젓빛 곰팡이병에 대한 저항성을 나타내는 중요한 물질임을 시사한다.

References

- Angelini, L., L. Lazzeri, S. Galletti, A. Cozzani, M. Macchia and S. Palmieri. 1998. Antigerminative activity of three glucosinolate-derived products generated by myrosinase hydrolysis. *Seed Science and Technology* 26:771-779.
- Barth, C. and G. Jander. 2006. *Arabidopsis* myrosinase TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *Plant J.* 46:549-562.
- Denby K.J., P. Kumar and D.J. Kliebenstein. 2004. Identification of *Botrytis cinerea* susceptibility loci in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 38:473-486.
- Fenwick, G.R., R.K. Heaney R.K. and W.J. Mullin. 1983. Glucosinolate and their breakdown products in food and food plants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 18:123-201.
- Glivetić, T., K. Delonga and J. Vorkapic-Furac. 2008. Glucosinolates and their potential role in plant. *Periodicum Biologorum* 110: 297-309.
- Hansen, B.G., R.E. Kerwin, J.A. Ober, V.M. Lambrix, T. Mitchell-Olds, J. Gershenzon, B.A. Halkier and D.J. Kliebenstein. 2008. A novel 2-oxoacid-dependent dioxygenase involved in the formation of the goiterogenic 2-hydroxybut-3-enyl glucosinolate and generalist insect resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 148:2096-2108.
- Kliebenstein, D.J., J. Gershenzon and T. Mitchell-Olds. 2001. Comparative quantitative trait loci mapping of aliphatic, indolic and benzylic glucosinolate production in *Arabidopsis thaliana* leaves and seeds. *Genetics* 159:350-370.
- Kliebenstein, D.J., V.M. Lambrix, M. Reichelt, J. Gershenzon and T. Mitchell-Olds. 2001. Gene duplication in the diversification of secondary metabolism: tandem 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases control glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13:681-693.
- Magrath, R., F. Bano, M. Morgner, I. Parkin, A. Sharpe, C. Lister, C. Dean, J. Turner, D. Ludiate and R. Mithen. 1994. Genetic of aliphatic glucosinolates. I. Side chain elongation in *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Heredity* 72: 290-299.
- Mithen, R. 1992. Leaf glucosinolate profile and their relationship to pest and disease resistance in oilseed rape. *Euphytica* 63:71-83.
- Pedras, M.S.C., E.E. Yaya and E. Glawischnig. 2011. The phytoalexins from cultivated and wild crucifers: Chemistry and biology. *Nat. Prod. Rep.* 28:1381-1405.
- Pedras, M.S.C. and V.K.S. Mamillapalle. 2012. The cruciferous phytoalexins rapalexin A, brassalexin A and erucalexin: Chemistry and metabolism in *Leptosphaeria maculans*. *Bioorganics & Medicinal Chem.* 20:3991-3996.
- Rate, D.N., J.V. Cuenca, G.R. Bowman, D.S. Guttman and J.T. Greenberg 1999. The gain-of-function *Arabidopsis* *acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *Plant Cell* 11:1695-1708.
- Rowe, H.C. and D.J. Kliebenstein. 2008. Complex genetic control natural variation in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Botrytis cinerea*. *Genetics* 180:2237-2250.
- Rowe, H.C. and D.J. Kliebenstein. 2007. Elevated genetic variation within virulence associated *Botrytis cinerea* polygalacturonase loci. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20: 1126-1137.
- Yu, H. and J.C. Sutton. 1997. Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. *Can. J. of Plant Path.* 19(3):237-246.

(Received 22 April 2014 ; Revised 25 July 2014 ; Accepted 12 August 2014)