

Cercospora kikuchii 菌絲生長에 필요한 窒素源, 炭素源 및 이 眞菌에 의한 細菌生長抑制

박 원 목 · 이 민 재

고려대학교 농과대학 식물보호학과

Nitrogen and carbon Sources for Mycelial Growth of *Cercospora kikuchii* and Inhibition of Bacterial Growth by the Fungus

Won Mok Park and Min Jae Lee

Department of Plant Protection, College of Agriculture, Korea University, Seoul 132, Korea.

要 約

本實驗은 窒素 및 炭素源이 *Cercospora kikuchii* 菌絲生長에 미치는 影響과 여러 배양조건에서 生長한 *C. kikuchii* 가 細菌生長을 阻止하는 정도를 알아보았다. *C. kikuchii* 菌絲生長에 適合한 窒素源은 yeast-extract 였고, 炭素源으로는 sucrose, glucose, maltose, fructose 를 添加하였을 때 菌絲生長이 좋았다. *C. kikuchii* 의 細菌生長阻止 實驗에서 wild type 은 pH 條件은 5.0 에서, 窒素源으로는 yeast-extract 또는 peptone 을 添加하였을 때, 炭素源으로는 sucrose, maltose, glucose, fructose 를 添加한 培地에서 生長하였을 때 *Erwinia carotovora* 와 *Pseudomonas solanacearum* 의 生長을 크게 阻止시켰다. 그러나 albino 돌연변이균 주는 실험된 細菌의 生長을 거의 阻止시키지 못하였다.

ABSTRACT

The present reserches were carried out to examine the favorable nutritional conditions for mycelial growth of *Cercospora kikuchii*, and inhibition of bacterial growth by the fungus at various cultural conditions. As the nitrogen source, the fungus grew better on yeast-extract than the other sources of nitrogen tested. Sucrose, glucose, maltose and fructose were good sources of carbon for mycelial growth of the fungus. Two isolates of *C. kikuchii*, wild types A and B, inhibited the growth of bacteria on the medium containing yeast-extract or peptone as the nitrogen source, and sucrose, glucose, maltose or fructose as the carbon source, at pH 5.0. However, the albino mutant showed very little inhibitory effect under the same conditions.

Key words: *Cercospora Kikuchii*, carbon, nitrogen, bacteria, antagonism.

結 論

Cercospora kikuchii (Matsumoto & Tomoyasu) Gardner 는 莖葉斑病을 일으키는 菌으로, 이 病原菌의 生理的 特性에 대해서는 아직도 밝혀져야 할 것

이 많다. *Cercospora spp* 의 孢子形成과 菌絲生長은 環境要因과 營養條件에 의해 많은 影響을 받는다 고 알려져 있다(1, 2, 10). Murakishi(8)는 *C. kikuchii* 가 生長하는데 適合한 溫度는 28°C, 酸度는 pH 5.9 라고 報告하였다. Chen 등(3)은 培地種類와 光線 등이 *C. kikuchii* 의 孢子形成과 菌絲生長에 미

치는 影響에 대해 報告하였다. 그러나 營養源이 *C. kikuchii* 生長에 미치는 影響에 관한 研究는 부족한 것 같다.

또한 *Cercospora*는 一般的으로 培地上에서 色素를 分泌하는 것으로 알려져 있고 Kuyama 등 (5)이 *C. kikuchii*에서 色素를 처음으로 分離하여 cercosporin 이라고 命名하였다. *Cercospora* spp.가 分泌하는 色素는 細菌의 生長을 阻止하며(4, 7) 色素分泌는 培養基, 溫度, 光線 등의 環境要因이 影響을 미친다고 하였다(4).

本 實驗은 窒素源과 炭素源이 *C. kikuchii* 菌絲生長에 미치는 影響과 여러 培養條件에서 生長한 *C. kikuchii*가 植物病原細菌의 生長을 阻止하는지 알아 보기 위하여 실시되었다.

材料 및 方法

菌株: 本 實驗에 使用한 菌株(*Cercospora kikuchii*)는 紫斑病에 걸린 大豆種子에서 單孢子分離하여 얻은 2菌株인 wild type A, wild type B, 와 albino 돌연변이 1 菌株을 감자실당한천배지(PSA)에 培養하여 使用하였다. albino 돌연변이균주를 얻기 위하여 wild type A의 菌絲懸濁液을 0.1% sodium deoxycholate가 添加된 培地위에 도포한 후 암실에 설치되어있는 紫外線燈을 30 cm 높이에서 30분동안 照射하였다. 紫外線을 照射한 후 사레를 은박지로 싸서 25°C 恒溫器에서 7日間 培養한 후에 色素를 形成하지 않는 菌叢을 選拔하였다. 이때의 紫外線處理 結果 97%정상균의 致死率을 나타내었다.

저지원실험을 위해서는 인삼연초연구소에서 분양 받은 *Erwinia carotovora*와 *Pseudomonas solanacearum*을 使用하였다.

營養素가 菌絲生長에 미치는 影響: 窒素源이 菌絲生長에 미치는 影響을 알아보기 위하여, czapek-dox agar 培地(NaNO₃ 除外)를 基本培地로 하였고 窒素源으로는 yeast-extract, peptone, (NH₄)₂-SO₄, NaNO₃를 각각 2g/l를 添加하였다. 培地가 담긴 사레의 中央에 *C. kikuchii*의 菌사절편(直徑 3mm)을 接種한 후 25°C 恒溫基에서 10日間 培養한 후 菌叢의 直徑을 測定하였다. 또한 同一 培地에서 한천을 添加하지 않은 液體培地에 菌사절편(直徑 3mm)을 接種하여 12日間 袋澱培養 후 여과지(Whatman No 1)로 걸러 菌絲를 수집 후 80°C 에서 24 시간 乾燥후 건물중을 測定하였다. 炭素源의

효과실험을 위해 starch, sucrose, maltose, glucose, fructose, sodium-acetate, glycerine을 炭素源으로 使用하였다. 基本培地로 czapek-dox 培地(yeast-extract 2g/l 添加, sucrose 除外)를 使用하였고 개개의 炭素源은 30g/l씩을 添加하였다. 菌叢의 直徑은 培養 10日 후에 測定하였고 건물중은 11日間 培養한 후에 測定하였다. 이들 실험은 모두 4 반복 실시하였다.

培養條件에 따른 *C. kikuchii*의 細菌生長 阻止: *C. kikuchii*의 培地酸度 影響을 관찰하기 위하여 czapek-dox agar 培地(yeast-extract 3g/l 添加)를 0.1 M phosphate buffer를 使用하여 pH 4.5, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0으로 酸度를 조절하였다. 이 培地에 *C. kikuchii*를 25°C에서 12日間 培養한 후 菌사절편을 저지원 실험에 使用하였다. 또한 細菌의 生長阻止에 대한 窒素源과 炭素源의 影響을 알아보기 위한 영양원 실험에서도 비슷한 方法으로 여러 가지 窒素源 및 炭素源을 添加시킨 固體培地에서 生長시킨 *C. kikuchii*를 이용했다.

저지원 실험은 300 ml의 PSA를 살균하여 굳기 바로 전에(약 55°C) nutrient agar에서 2日 동안 배양한 실험細菌인 *Erwinia carotovora*와 *Pseudomonas solanacearum* 현탁액을 각각 10 ml씩 넣어 잘 혼합한 후에 사레에 부어 굳힌 후 미리 培養한 *C. kikuchii*의 菌사절편(直徑 8mm)을 올려놓았다. 이것을 28°C 恒溫器에서 24 시간 培養후에 실험세균의 生長을 阻止함으로써 形成된 저지원의 크기를 菌사절편에서부터 반경을 測定하였다.

結果 및 考察

營養素가 菌絲生長에 미치는 影響: 固體培養에서 窒素源이 *C. kikuchii* 菌絲生長에 미치는 影響을 알아본 결과 一般的으로 실험한 모든 菌株가 yeast-extract를 添加한 培地에서 가장 잘 자랐고 peptone, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄ 順이었다. (그림 1). 그러나 이들 菌株중 wild type B는 yeast-extract 添加 培地에서 다른 菌株보다 生長이 좋지 않았고 NaNO₃ 添加 培地에서는 albino 돌연변이균주의 生長이 가장 낮았다. 液體培養에서 얻어진 菌사건물량은 3菌株 모두 yeast-extract 添加 培地에서 가장 높았다. (그림 2). peptone 添加 培地에서 이들 菌株 生長이 다음으로 양호했고 무기태질소인 (NH₄)₂SO₄, NaNO₃에서는 菌絲生長이 좋지 않았다. 이러한 실험

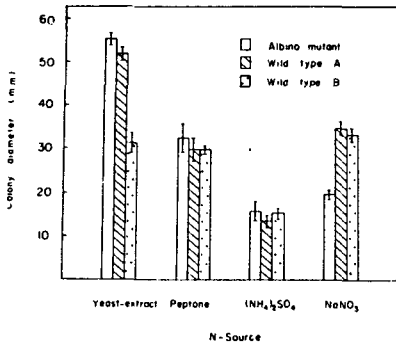


Fig. 1. Mycelial growth of *Cercospora kikuchii* on modified czapek-dox agar containing different nitrogen sources 10 days after inoculation.

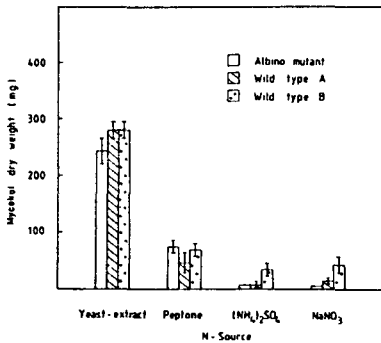


Fig. 2. Mycelial dry weight of *Cercospora kikuchii* in modified czapek-dox medium containing different nitrogen sources 12 days after inoculation.

실험결과를 볼 때 *C. kikuchii* 인공배양에 알맞는 질소원으로는 일반적으로 유기태 질소인 yeast-extract 나 peptone 이 무기태 질소보다 적합하다고 생각된다. 그렇지만 yeast-extract, peptone 에는 질소원외에 다른 생장요인이 포함되어 있으므로 이의 영향도 고려해야 할 것이다. NaNO₃ 에서는 균량의 직徑은 컸으나 균량의 짜임이 느슨하였고, (NH₄)₂SO₄ 添加培地에서는 液體, 固體培地에서 모두 菌絲生長이 억제되었다. 이것은 Slavely 등 (9) 과 Berger 등 (1) 이 다른種의 *Cercospora* 에서 報告한 것과 一致한다.

炭素원이 菌絲生長에 미치는 影響에 대한 比較에서 albino 돌연변이균주와 wild type A 는 sucrose, glu-

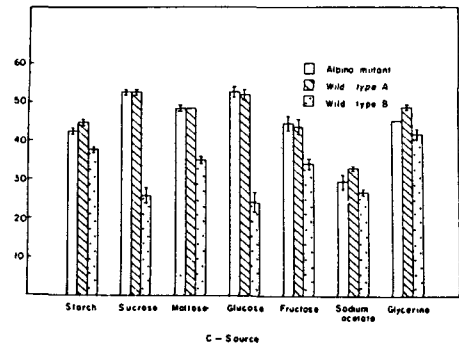


Fig. 3. Mycelial growth of *Cercospora kikuchii* on modified czapek-dox agar containing different carbon sources 10 days after inoculation.

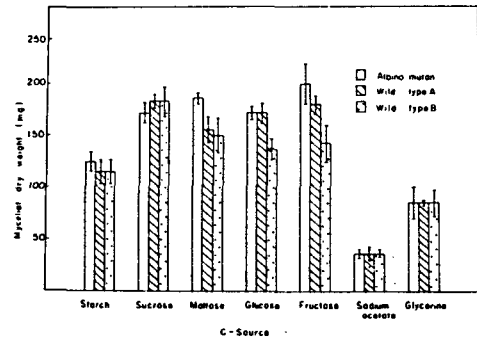


Fig. 4. Mycelial dry weight of *Cercospora kikuchii* in modified czapek-dox medium containing different carbon sources 11 days after inoculation.

ucose, maltose, fructose, glycerine 添加培地에서 잘 자랐다. 그러나 wild type B는 실험한 모든 炭素源에 대해 albino 돌연변이균주나 wild type A에 비하여 菌叢이 작았으며 glycerine 添加培地에서 가장 잘 자랐고, 다음으로 starch, maltose, fructose에서 잘 자랐다(그림 3). 固體培地에서 이러한 차이는 菌株間的 炭素源 선호도가 다르기 때문에 나타나는 것으로 보인다. 건물량은 sucrose, maltose, glucose, fructose에서 3菌株 모두 컸다(그림 4). 따라서 sucrose, maltose, glucose, fructose가 *C. kikuchii* 菌絲生長에 적합한 것으로 생각되며 이러한 比較는 *C. nicotianae* (9)와 *C. zebrina* (1)의 培養결과와 一致한다. 그러나 Landers (6)는 starch 添加培地는 다른 炭素源을 添加했을 때보다 *C. arachidi-*

*cola*의 건물량이 높다고 報告하였다. 이 報告와 本 실험결과에서와 차이가 있었던 것은 種에 따라 炭素源의 利用度가 다르기 때문에 생각된다.

細菌生長 阻止 : 여러 pH 條件에서 生長한 *C. kikuchii*가 細菌의 生長을 阻止하는 정도는 (표 1)과 같다. *E. carotovora*와 *P. solanacearum*에 대해 pH 4.5, 5.0에서 生長한 wild type은 細菌生長을 크게 阻止한 반면 다른 pH 條件에서는 저지정도가 낮거나 阻止하지 못하였다. albino 돌연변이균주는 모든 pH 條件에서 細菌生長阻止 정도가 낮거나 阻止하지 못하였다. 지지원 形成이 培地pH의 影響인지 또는 *C. kikuchii*의 分泌物에 의한 것인가를 판단하기 위해 *C. kikuchii*를 培養하지 않은 同一한 pH의 培養基 結편을 대조구로 使用한 결과 細菌의 生長이 阻止되지 않았다. 또한 여러 pH에서 生長한 *C. kikuchii*를 배양기 뒷면에서 관찰할 때 wild type은 pH 條件에 따라 약간의 色의 차이를 나타내었으며 pH 4.5, 5.0에서는 色素가 培地로 많이 확산되어 있음을 볼 수 있었다. 따라서 細菌의 生長을 阻止하는 것은 *C. kikuchii*가 分泌한 色素와 관련있을 뿐만

아니라 培地의 pH 條件도 阻止物質 分泌에 影響을 미치는 것으로 생각되어진다.

窒素源이 다른 培地에서 生長한 *C. kikuchii*로 細菌生長 阻止정도를 비교한 결과, 대상細菌에 대해 albino 돌연변이균주는 細菌生長 저지정도가 낮거나 阻止하지 못하였다. wild type은 yeast 또는 peptone이 添加된 培地에서 生長하였을 때 細菌生長을 크게 阻止하였을 뿐만아니라 色素의 分泌도 많았다. 그러나 $(NH_4)_2 SO_4$ 나 $NaNO_3$ 를 窒素源으로 添加하였을 때에는 wild type에서도 色素가 거의 分泌되지 않았으나 細菌의 生長을 阻止하였다. 이것은 菌絲가 자람에 따라 培地의 pH가 내려가 저지원실험 당시는 酸度가 약 2.0으로 되었던 것으로 보아 이 때의 저지원은 酸에 의한 影響으로 形成된 것으로 보여진다. 따라서 窒素源도 *C. kikuchii*가 色素를 分泌하는데 影響을 주는 要因으로 생각되며 이것은 細菌生長을 阻止하는 정도에 차이를 나타내는 것으로 보여진다(표 2).

炭素源이 細菌生長 阻止物質 分泌에 미치는 影響을 알아본 결과, albino 돌연변이균주는 細菌生長을

Table 1. Growth inhibition of two pathogenic bacteria by *Cercospora kikuchii* isolates grown at different pH in modified czapek-dox agar

Test bacteria	<i>C. kikuchii</i>	Inhibition radius (mm) at:				
		4.5	5.0	6.0	7.0	8.0
<i>Erwinia carotovora</i>	Albino mutant	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Wild type A	9.7	12.0	0.0	0.0	0.0
	Wild type B	12.3	12.0	0.0	0.0	0.0
	Control	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Albino mutant	5.0	0.5	0.0	0.0	0.0
	Wild type A	9.3	9.0	1.0	2.0	1.0
	Wild type B	12.2	12.2	1.5	2.0	1.0
	Control	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Table 2. Growth inhibition of two pathogenic bacteria by *Cercospora kikuchii* isolates grown in modified czapek-dox agar containing different nitrogen sources

Test bacteria	<i>C. kikuchii</i>	Inhibition radius (mm) at:			
		Yeast-extract	Peptone	$(NH_4)_2 SO_4$	$NaNO_3$
<i>Erwinia carotovora</i>	Albino mutant	0.0	0.0	0.5	0.0
	Wild type A	10.3	7.3	4.5	0.0
	Wild type B	14.5	11.3	4.0	0.0
	Control	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Albino mutant	0.0	0.0	5.0	0.0
	Wild type A	5.0	8.3	6.0	0.0
	Wild type B	8.6	7.0	9.5	3.5
	Control	0.0	0.0	0.0	0.0

Table 3. Growth inhibition of two pathogenic bacteria by *Cercospora kikuchii* isolates grown in modified czapek-dox agar containing different carbon sources

Test bacteria	<i>C. kikuchii</i>	Inhibition radius (mm) at:					
		Starch	Sucrose	Maltose	Glucose	Fructose	Glycerine
<i>Erwinia carotovora</i>	Albino mutant	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Wild type A	0.0	11.7	12.0	11.3	12.0	3.0
	Wild type B	0.0	15.0	12.0	12.7	13.0	2.0
	Control	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Albino mutant	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Wild type A	1.7	7.0	7.0	5.0	6.0	1.7
	Wild type B	1.7	9.3	8.3	6.7	7.0	3.0
	Control	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

금지하지 못하였다. wild type도 starch나 glycerine을 추가한培地에서生長하였을 때에는細菌生長저지정도가 낮았다. 반면 sucrose, maltose, glucose, fructose를 추가한培地에서生長하였을 때에는細菌의生長을 크게 금지하였다. 영양소원으로 窒素源뿐만 아니라 炭素源도 *C. kikuchii*의 色素分泌에 影響을 미치는 것으로 생각된다. starch 또는 glycerine을 추가한培地에서는 wild type도 色素한 거의 分泌하지 않음을 볼 수 있었다(표 3).

以上の結果에서 보는 바와 같이 pH, 窒素源, 炭素源은 *C. kikuchii*가 色素를 分泌하는데 影響을 주며 色素를 많이 生産하는 條件에서 *E. carotovora*와 *P. solanacearum*의 生長을 阻止하는 정도가 큰 것을 볼 수 있었다.

參 考 文 獻

1. BERGER, R. D. & HANSON, E. W. (1963). Relation of environmental factors to growth and sporulation of *Cercospora zebrina*. *Phytopathology* 53:286-294.
2. CALPOUZOS, L. & STALLKENCHT, G. F. (1965). Sporulation of *Cercospora beticola* affected by interaction between light and temperature. *Phytopathology* 55:1370-1371.
3. CHEN, M. D. & HALLIWELL, R. S. (1979). Environmental factors influencing growth and sporulation of *Cercospora kikuchii*. *Mycologia*

71:1150-1157.

4. FAJOLA, A. O. (1978). Cercosporin, a phyto-toxin from *Cercospora* spp. *Physiol. Pl. Pathol.* 13:157-164.
5. KUYAMA, S. & TAMURA, T. (1957). Cercosporin, A pigment of *Cercospora kikuchii* Matsumoto et Tomoyasu. I. Cultivation of fungus, isolation and purification of pigment. *J. Am. Chem. Soc.* 79:5725-5726.
6. LANDERS, K. E. (1964). Growth of *Cercospora arachidicola* in a glucose-phosphate asparagine-thiamine agar medium. *Phytopathology* 54:1235-1239.
7. LYNCH, F. J. & GEOGHEGAN, M. J. (1979). Antibiotic activity of fungal perylene-quinone and some its derivatives. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 72:31-37.
8. MURAKISHI, H. H. (1951). Purple seed stain of soybean. *Phytopathology* 41:305-318.
9. STAVELY, J. R. & NIMMO, J. A. (1968). Relation of pH and nutrition to growth and sporulation of *Cercospora nicotianae*. *Phytopathology* 58:990-991.
10. STAVELY, J. R. & NIMMO, J. A. (1969). Effect of temperature upon growth and sporulation of *Cercospora nicotianae*. *Phytopathology* 59:496-498.