

炭疽病菌 *Colletotrichum dematium* f. sp. *capsicum*에 감염된 고추의 병態組織學的 觀察

李相範* · 鄭鳳九** · 沈在燮**

* 湖南作物試驗場

** 忠北大學校 農科大學 農生物學科

Histopathology of Red Pepper Plant Infected with *Colletotrichum dematium* f. sp. *capsicum*

Sang Bum Lee*, Bong Koo Chung** and Jae Sup Shim*

* Honam Crop Experiment Station, Iri, 510 Korea

** Department of Agricultural Biology, College of Agriculture,
Chung Buk National University, Cheong Ju 310, Korea

要 約

分生孢子는 發芽管의 數에 따라 孢子內에 隔膜이 形成된다. 抵抗性 品種(금장 2호, 홍일품)과 感受性 品種(하늘초, 새고추) 間의 附着器 形成率은 큰 差異가 없었고 附着器의 模樣은 円形, 楕圓形 및 星狀體 等 多樣하며 接種 12時間에서 그 形成率은 最高에 達했다. 接種 24時間에 抵抗性 品種의 잎과 열매에서는 過敏性인 작은 褐色病斑이 觀察되면서 表皮下 組織細胞內에 甚한 原形質分離가 일어났으나 感受性 品種에서는 時間의 經過에 따라 큰 病斑으로 急速히 進展 擴大되었고 時間이 經過함에 따라 菌絲가 下部組織으로 擴散되었고 分生子口 및 剛毛의 出現은 接種 96時間 後에 觀察되었다. 感染種子의 種皮는 甚하게 崩壞되었을 뿐만 아니라 侵入菌絲도 觀察되었고 胚乳와 胚는 甚한 原形質分離를 일으켰다.

ABSTRACT

Upon germination, a conidium was septated in accordance with number of germ tubes. The percentages of appressorial formation were not different between the resistant cultivars (Kumchang NO. 2 and Hongilpum) and the susceptible cultivars (Haneulcho and Saegochu). Appressorial form was various such as round, elliptical or star-shaped. The maximum number of appressoria was shown at 12 hours after inoculation. By 24 hours after inoculation, hypersensitive tiny brown lesions were observed on the leaves and fruits of the resistant cultivars. Epidermal cells under cuticle layer of the resistant Kumchang NO. 2 fruit showed severe plasmolysis, while on the susceptible cultivars, the lesion was largely extended to following incubation. Subcuticular infection hyphae were profusely colonized in the disintegrated tissues. Acervuli and setae on the stromatic structure were formed at 96 hours. The infected seed coat was not only severely collapsed, but also infection hyphae

were observed on the disintegrated seed coat, resulting severe plasmolysis of nucellus and embryo.

Key words: Acervulus, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Capsicum annum*.

緒 論

最近 고추炭疽病은 *C. gloeosporioides*에 의한炭疽病과 함께 每年發生하여 고추多收穫에 가장 큰制限要因의 하나가 되고 있다. 특히露地栽培에서降水量이 많고濕도가 높은 늦여름에發病이 많으며生育初期부터收穫末期까지全生育期에 걸쳐發生하여被害가 큰實情이다. 잎에는 대개暗褐色의圓形 또는不定形의小斑點이 생기고擴大되며中央이灰色을 띤다. 열매의病徵은感染初期에水浸狀의小斑點이 생기면서褐變하고同心輪紋을 형성하고씩으며病斑이中央部는 약간灰色을 띤다(3).

鄭(4)은 콩炭疽病菌 *Glomerella glycines*에 의한侵入構造의觀察에서侵入前, 侵入 및 侵入後로三分하고 侵入前構造를發芽, 發芽管伸張 및 附着器形成 등으로細分하였다. 또한 Robert(11) 등은 *Colletotrichum capsici*에 의한木花다래썩음病的病態解剖學的研究에서 *C. capsici*에 의한다래썩음病과 *C. gossypii*(=*Glomerella gossypii*)에 의한木花炭疽病을區分觀察하고寄主特異적으로 갖는 Polyphenol類와 Gossypol 같은 것이過敏性에關與한다고說明하였다. 이러한 *Colletotrichum* spp.의 侵入에 따른感染組織에서의病態解剖學的研究이 이미外國에서는相當히報告되었으나(2, 5, 8, 11), 國內에서는 거의研究가 進行되지 않은 形편이다.

그러므로炭疽病菌에 의한 잎과 열매에서의 侵入生理와 抵抗性品種과 感受性品種間의 感染組織의 差異를病態解剖學적으로究明하여 고추炭疽病的防除對策樹立과 抵抗性品種育成에 基礎資料를 얻고져本實驗을遂行하였으며 이에 얻어진結果를報告하는 바이다.

本研究는 韓國科學財團의 研究費 支援으로 이루어졌으며 이에 韓國科學財團에 深甚한 謝意를 表한다.

材料 및 方法

供試品種 및 病原菌의 接種. 抵抗性品種인 금장 2호(Kumchang No. 2)와 홍일품(Hongilpum), 感受性品種인 하늘초(Haneulcho)와 새고추(Saegochu)를

溫室에서栽培하여供試하였는데木葉 5~6葉期의 苗를 接種에 사용하였고 열매는 0.52%의 次亞鹽酸나트륨(NaOCl₂)으로表面消毒한後殺菌수로 2回洗滌하여 사용하였다. 接種에 사용한病原菌은 28°C의定溫器에서 PSA에 7日間培養한後殺菌수로 稀釋하여懸濁液을調劑하였고 그濃度는 Microsyringe法(7)으로 2×10⁴ ml로調劑하였다. 調劑된 孢子懸濁液을小形噴霧器로供試고추 苗와 열매에噴霧接種하였으며對照區로 사용된 苗와 열매에는殺菌수를噴霧處理하였다. 處理된試料는飽和濕度를維持시키기 위하여 비닐로 덮은後 28°C의定溫器에 4時間 동안 두었다.

잎表面에서의附着器形成率 調査. 接種後 4時間間隔으로 接種區와 對照區의 잎을採取하여 5×5 mm² 크기로 자른 다음 FAA(95% Ethyl alcohol 50 ml, Glacial acetic acid 5 ml, 40% Formaldehyde 10 ml, 蒸溜水 35 ml)로 4°C에서 1時間 固定하여(1) Shipton等(12)이 考案한 Whole-Leaf Clearing and Staining法을 사용하였으며 5%의 Glycerin 溶液에埋藏하여各處理當 400倍視野에서 50個의 視野를檢鏡하여附着器形成率을 調査하였다.

感染組織의顯微鏡的觀察. 接種後 4時間間隔으로 36時間까지 接種區와 對照區에서採取한 열매의組織을 5×5 mm² 크기로 잘라 FAA로 4°C에서 1時間 固定하였다. 固定이 끝난組織은 蒸溜水로 2回 洗滌한 후 50%, 70%, 90% 알콜에各各 30分間 脫水하고 無水알콜(100%)에서 60分씩 2回 脫水後(1) Cryo-M-Bed로埋藏한 다음 Instant Freezing Aerosol을噴霧하여急速冷却시킨 후 -20°C에서 1時間 동안 完全히 包埋된組織을 Freezing Microtome (Type OTF/AS/Z)으로 10~15 μm 두께로 잘랐고 잘려진切片은 깨끗한 슬라이드 위에 놓고 Lactophenol Cotton Blue 및 Robert(10)가 考案한 Freezing Microtome의 染色法으로 染色하였고顯微鏡觀察後 寫眞 撮影하였다.

結 果

病徵 및 附着器 形成率 調査. 定溫處理 24時間後 外形의인觀察에서 抵抗性品種인 금장 2호와 홍일

종의 잎과 열매에 1mm 이하의 작은褐色病斑이觀察되었으며 이런病斑은 조금씩擴大되어 36時間後에는 더욱 짙게 되었으나急速한進展은되지 않았다.感受性品種인 하늘초와 새고추에서도抵抗性品種과初期에는 큰差異가 없었으나 시간이經過함에 따라病斑進展이觀察되었다.

고추炭疽病菌에 대한供試品種에서의附着器形成率は그림 1과 같다.附着器形成率は抵抗性品種금장2호와 홍일품 및感受性品種하늘초와 새고추間에 큰差異를 보이지 않았다.處理後 5時間에서는 4~8%의形成率을 보였으며 8時間 및 12時間까지는增加하는傾向이었으나 30時間以後에는오히려 조금씩減少하는傾向을 나타내었다.處理 2時間에서抵抗性品種인금장2호와 홍일품은各々 80%, 82%의形成率을,感受性品種인하늘초와 새고추는各々 86%, 83%의形成率을 나타냈다.그런데 36時間에는금장2호 77%, 홍일품 78%, 하늘초 82% 및 새고추 80%의形成率로서 12時間에 비해減少하는傾向을 보였다.

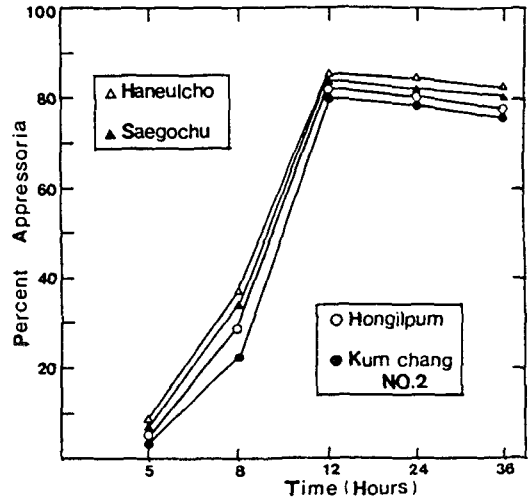


Fig. 1. Comparison with appressorial formation of *Colletotrichum dematium* f. sp. *capsicum* inoculated on the pepper seedlings of the resistant cultivars, Hongilpum and Kumchang NO. 2 and the susceptible cultivars, Haneulcho and Saegochu during inoculation of 36 hours at 28°C.

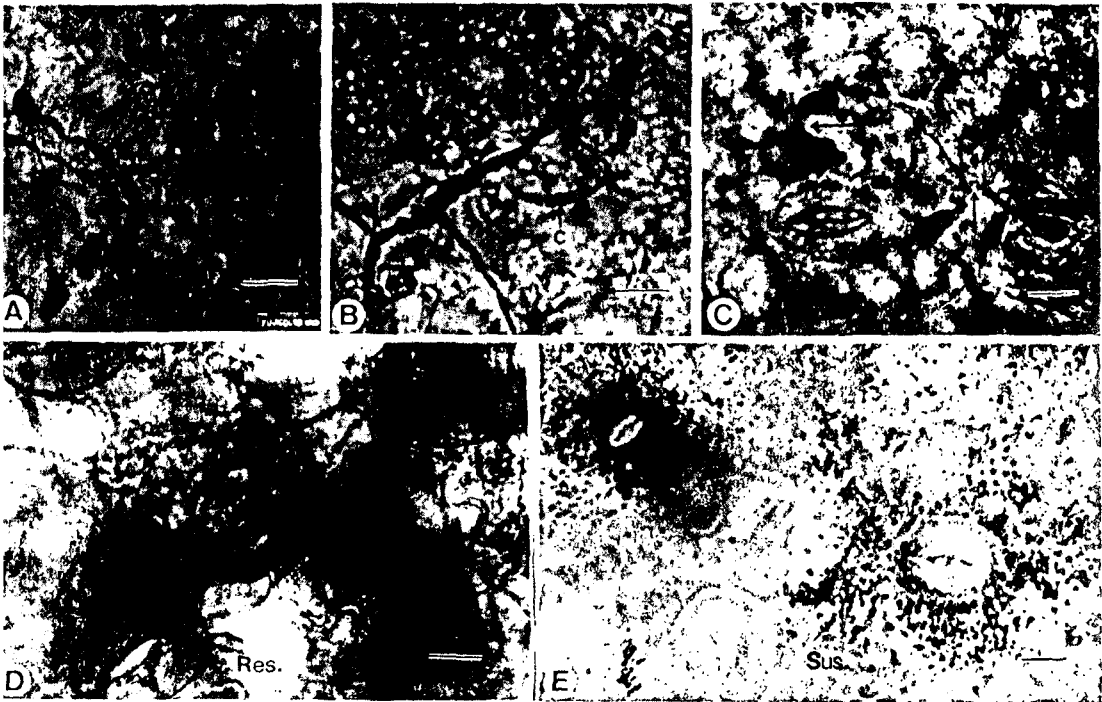


Fig. 2. Conidial germination and appressorial formation of *Colletotrichum dematium* f. sp. *capsicum* on red pepper leaves. A. Germ tubes and appressoria formed 12 hours after inoculation. B. One side germ tube without conidial septum. C. Germ tubes were septated by septum, 16 hours after inoculation. D. Hypersensitivity response on the resistant cultivar, Kumchang NO. 2, 30 hours after inoculation. Stomata turned into brown as well as sudden necrosis. E. Susceptible response of Haneulcho, 48 hours after inoculation. Infected guard cells disintegrated and deeply stained. A=appressorium, C=conidium, GT=germ tube, ST=Septum, Res.=resistance, Sus.=susceptible, Bars=10µm.

發芽의 特徵을 觀察한 結果 分生孢子的 한쪽이나 양쪽 혹은 中間部에서도 發芽管이 形成되는데 이 때 無隔膜의 分生孢子에는 1~3個의 隔膜이 생겨났다(그림 2, A). 發芽管이 伸張되면 發芽管 끝에 附着器가 形成되며 附着器의 模樣은 圓形이나 橢圓形이고 때로는 星狀體 模樣도 觀察되었다(그림 2, B). 時間이 經過함에 따라 伸張된 發芽管은 分枝된다(그림 2, C).

앞 表面에서 觀察할 수 있었던 抵抗性 品種과 感受性 品種間의 壞死反應 差異는 處理 30時間에서, 금

장 2호 品種은 侵入된 氣孔이 急激히 褐變 枯死하 反面, 하늘초 品種은 氣孔周圍가 破壞되면서 더 고 파랗게 染色되는 感受性 反應이 觀察되었다(그 2, D, E).

感染組織의 病態組織學的 觀察. 금장 2호 品種 對照區에서 採取한 果皮組織의 表皮(Cutical) 위에 分生孢子나 附着器가 觀察되지 않았으며 外皮(Epic mis) 및 外皮下의 柔組織이 조금씩 부풀어 오른 態였고 큰 核과 相對的으로 작은 空胞과 稠密한 形質을 包含하고 있었다(그림 3, A).



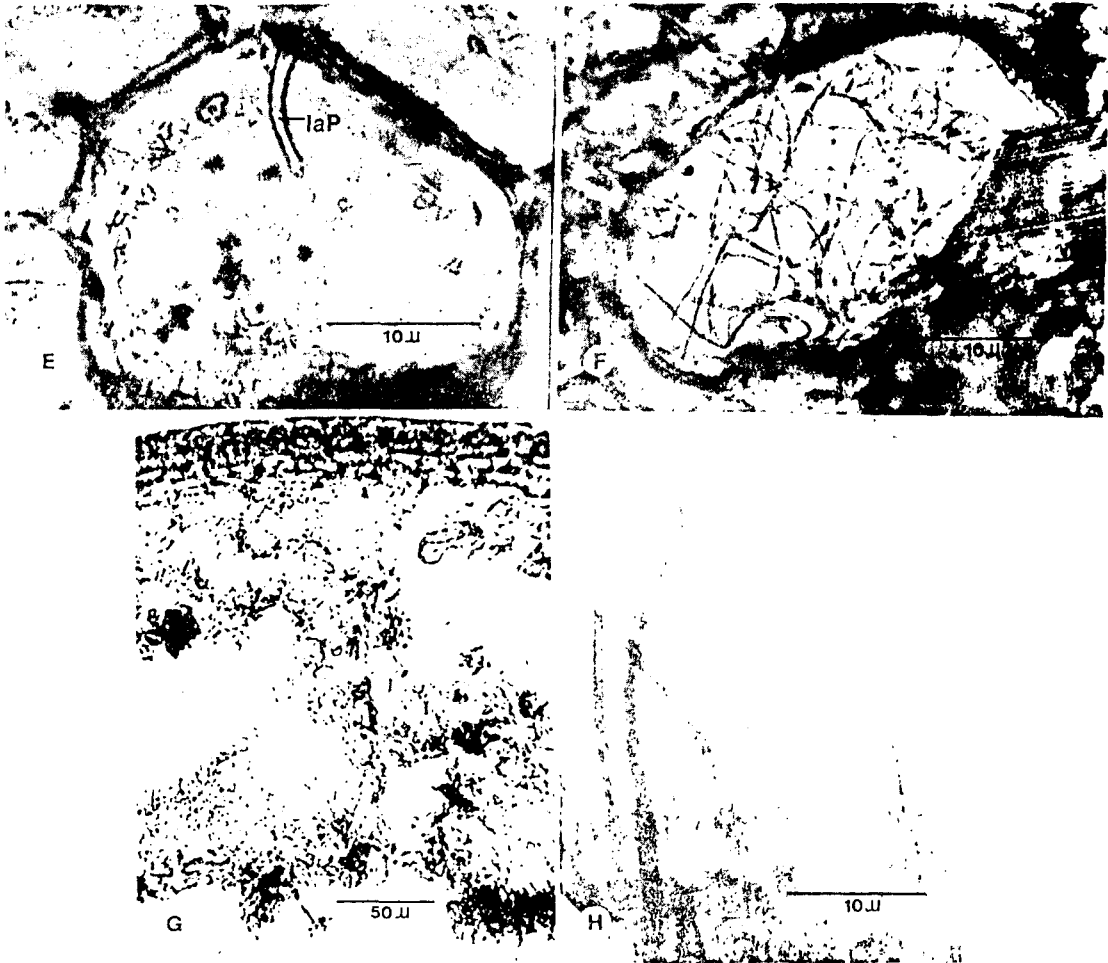
Fig. 3. Histopathological observation of *Colletotrichum dematium* f. sp. *Capsicum* on red pepper fruit. A. Healthy pericarp tissues of fruit. B. Appressoria, disintegration of cell walls and plasmolysis were observed. C. In 36 hours after inoculation, subcuticular hyphae appeared. D. After 48 hours inter- or intra-cellular hyphae invaded to parenchyma tissue.

接種區에서는 24時間에 열매의 表皮上에 附着器가 形成되었으며 外皮組織內的 細胞들은 심한 原形質分離 및 細胞壁의 崩壞가 동시에 일어나고 있었다(그림 3, B). 接種 36時間에는, 表皮 아래에서 1~2.5 μ m 程度の 侵入菌絲가 外皮細胞壁이 부풀어 오르는 部分에서 觀察되었다(그림 3, C). 接種 48時間에는, 細胞壁이 完全히 부풀어 올랐고, 細胞內나 細胞間隙菌絲가 果皮의 外皮쪽에서 下部組織으로 侵入하였으며 0.5~1.2 μ m 程度の 侵入菌絲는 急速도로 柔組織, 通導細織 및 內皮로 侵入하였다(그림 3, D, E). 接種 60時間에는, 組織의 內部에 많은 菌絲가 漫延하여 癒合되는 것이 觀察되었다(그림 3, F). 接種 72時間에는, 果皮組織의 內部에 病原菌의 子座

組織이 形成되기 시작하였다(그림 3, G와 4, A).

그림 4, B는 4, A를 확대한 寫眞인데 分生胞子와 剛毛가 없는 子座構造를 볼 수 있을 뿐만 아니라 內部 柔組織의 崩壞는 外皮와 內皮의 分離를 招來하고 있다(그림 4, B). 子座組織에서 나타난 螺旋狀構造(그림 4, C)는 分生子柄을 形成하였고, 連鎖狀構造(그림 4, D)는 分化되어 剛毛를 形成하였다. 이렇게 하여 形成된 分生分堆는 그림 4, E의 그림과 같이 分生胞子와 剛毛를 보여주고 있다(그림 4, E).

感染된 열매에서 採取한 種子에서도 열매와 같은 病原菌의 侵入을 觀察할 수 있었다. 種皮는 심하게 崩壞되었고, 侵入菌絲도 觀察되었으며 특히 胚乳細胞와 胚細胞들이 심한 原形質分離 現象을 나타내었



E. Intra-cellularhyphae. F. Hyphae profused in the fruit tissues. G. Stromatic structures were formed in endocarp at 72 hours after inoculation. H. Cross section of matured acervulus. A=appressorium, C=conidium CW=collapsed wall, H=penetration (hyphae, Iap=intracellular hyphae, N=nucleus, P=plasmolysis, SCW=swollen cell wall, Sff=subcuticular hyphae.

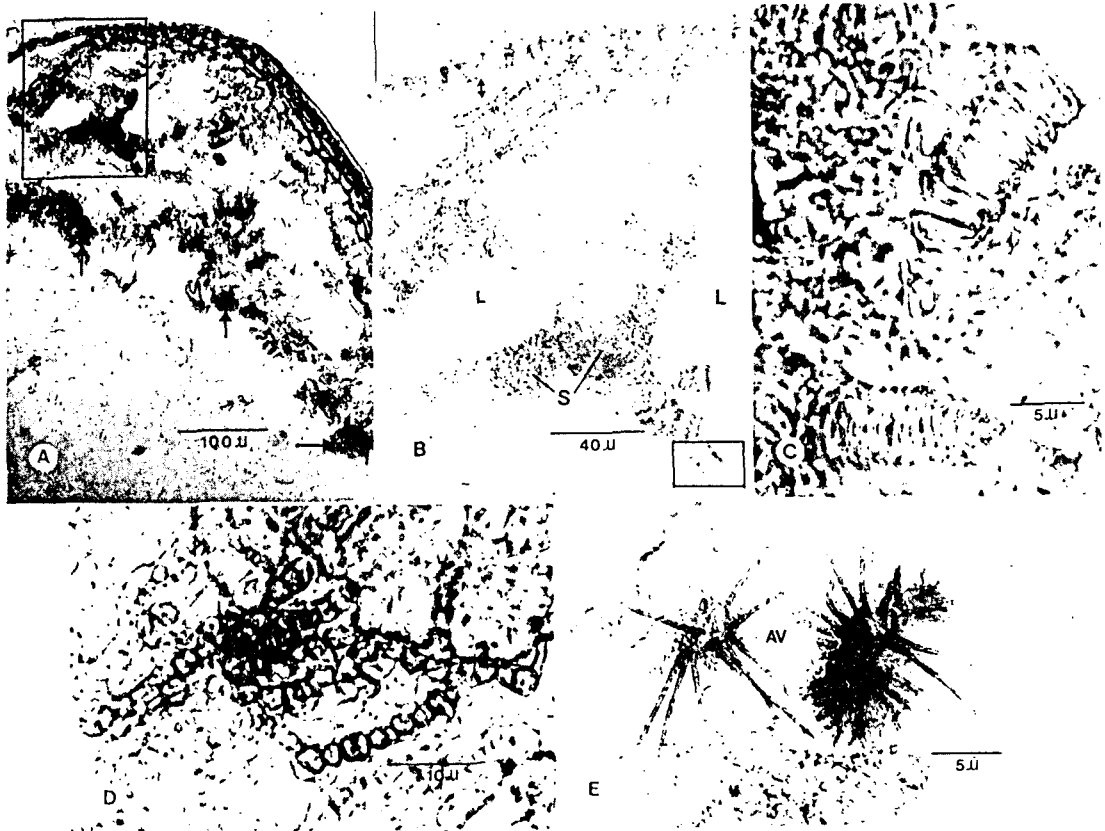


Fig. 4. Acervulus development *colletotrichum dematium* f. sp. *capsicum* on the stromatic structure of infect pepper fruit tissue. A. Stromatic structure in the fruit. B. Stromatic structure without conidia and setae. C. Spring-like structure which may develop a frame of acervulus. D. Chain-like structure which develop setae. E. Typical acervulus with conidia and setae. AV=acervulus, L=lumen, S=stromatic structure, St=seta.

으며 종피와 배조직이分離되었다(그림 5).

侵入過程. 고추炭疽病菌 *Colletotrichum dematium* f. sp. *capsicum*의 時間經過에 따른 寄主의 잎이나 열매에서의 侵入過程을 要約하면 그림 6과 같다. 接種後 4~5時間에서, 病原菌의 孢子는 發芽하기 시작한다. 發芽하면 1~3個의 發芽管이 伸張되고 8時間에 附着器를 形成하게 된다. 거의 附着器는 伸張된 發芽管 끝에 形成되지만 어떤 것은 發芽管의 伸張없이 附着器가 形成되기도 한다. 附着器가 形成되면 侵入菌絲가 伸張된 後 接種 12時間 頃이며 氣孔 組織에 附着器가 形成되며 接種 30時間에는 組織內로 侵入한 菌絲가 柔組織, 通導組織 等の 下部組織으로 伸張되어 細胞間隙이나 細胞內로 擴散됨이 觀察되었다. 이와 같이 組織속에서 侵入한 菌絲는 瘻合되어 子座構造를 形成하게 되는데 接種後 72時間 頃이다. 子座構造는 열매의 內部에 먼저 形成되고 그 다음 96時間을 前後하여 果皮에도 分生子堆가 形成되었다(그

림 6).

考 察

고추炭疽病菌 *C. dematium* f. sp. *capsicum*이 發芽할 때 隔膜이 形成되는 것을 確認할 수 있었는데 이러한 觀察은 *Glomerella cingulata*에서 隔膜이 기며 1~2個의 發芽管이 形成된다고 報告한 것(1)과 木花炭疽病菌에 대하여 Robert等(11)이 報告境遇와 같았다. 그러나 隔膜의 形成이 發芽管 數를 決定할 수 있으나 그에 따른 侵入과의 關係를 더 檢討하여야 할 것이다.

앞에서의 侵入은 發芽管이 直接 氣孔 侵入도 하지만 主要로 附着器 形成後 侵入絲로 表皮細胞에 侵入한다. 抵抗性 品種과 感受性 品種間에 附着器 形成率의 差異가 없으나 侵入에 따른 壞死反應의 差異를 確認할 수 있었고 심한 原形質分離, 表皮下細胞壁

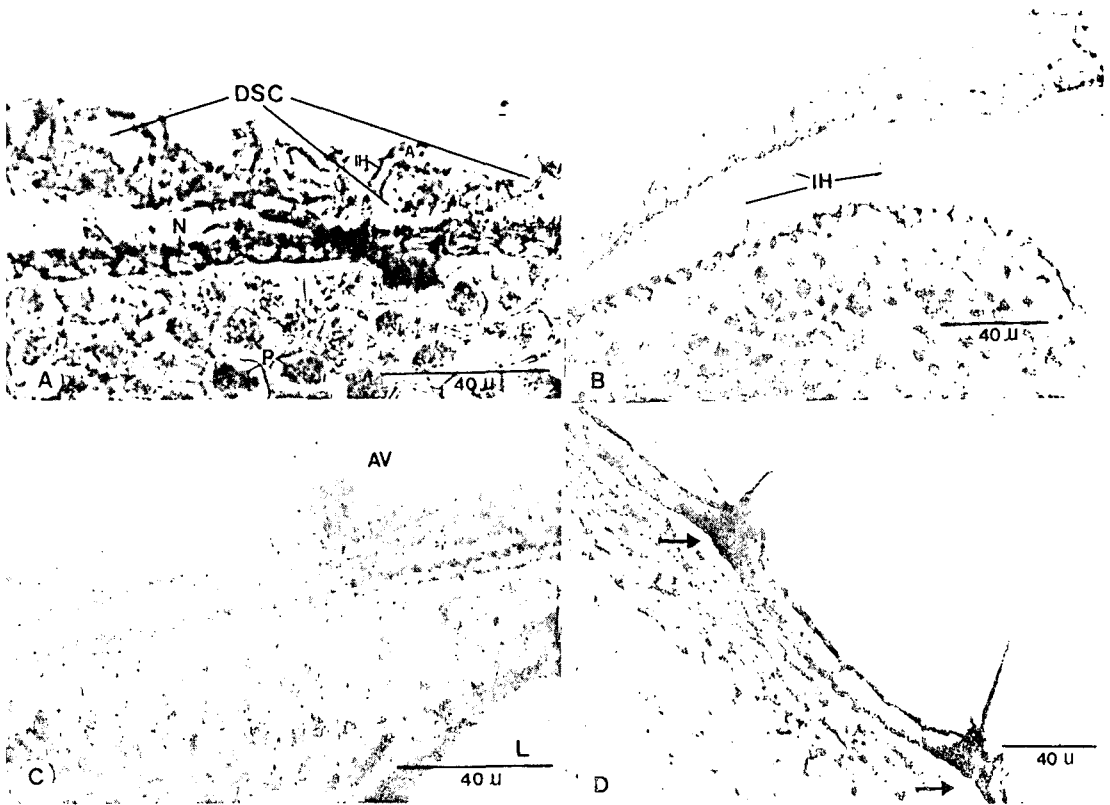


Fig.5. Histopathological observation of pepper seed, infected with *Colletotrichum dematium* f. sp. *capsicum*. A. Severely disintegrated seed coat. Especially, plasmolysis in the nucellus and embryo cells. B. Infection hyphae extended from seed coat to embryo. C. Acervulus on infected seed coat. D. Separation of endocarp from pericarp by infection. A=appressorium, AV=acervulus, DSC=disintegrated seed coat, IH=infection hyphae, N=nucellus, P=plasmolysis.

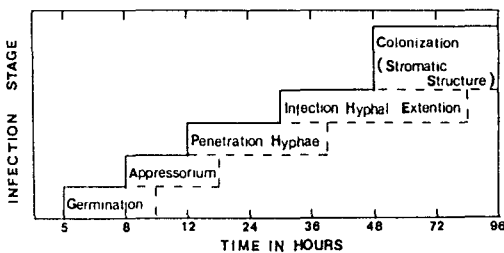


Fig.6. Schematic infection process of *Colletotrichum dematium* f. sp. *capsicum* in red pepper.

崩壞 및 핵이 작아지고 더 깊게染色되는過敏性反應이 30時間以前에觀察되었으나感受性品種에서는 48時間以後에도繼續된病斑의擴大를觀察할 수 있었다. 72時間後에는 열매의 내부에子座組織이形成되었고 그後外皮에分生子堆가形成되었는데 이는 열매의 내부가菌의生育에 더 많은營養源

과 더 좋은環境條件을造成하였기 때문에생기된다.

光學顯微鏡水準에서觀察할 수 있는組織學的變化는果皮나內皮에서菌絲의侵入進展과同時에柔組織細胞壁의明白한崩壞였고, 이에 따라組織의부풀어오름이 나타났으며崩壞된細胞壁은 잘染色되지 않았다. 그리고感染된 열매 및種子에서果皮와內皮의分離는柔組織細胞壁이崩壞될 때果皮에附着된部分이破壞되기 때문에發生하였다.

接種한 열매를 더 오랫동안 두었을 때 거의 모든 열매의組織이崩壞되는 데 이는 *C. dematium* f. sp. *capsicum*이 열매에侵入하여菌叢을形成함과同時에 Cellulase를分泌하는 것으로알려져 있고 Cellulose分解產物은 아마도 最初の炭素源으로利用되는 것으로推測된다(3, 6, 9). 表(4)은 고추炭疽病菌(*C. dematium*)의品種抵抗性研究에서抵抗性反應을 나타내는品種들은辛味種이고感受性品種들은

대체로 甘味種이었다고 報告한 것과 같이 炭疽病 發生과 炭素源 間에는 密接한 關係가 있음이 이미 밝혀진 바 있다.

本 實驗의 結果에 依하면 圃場條件下에서도 高溫多濕한 環境條件下에서는 적어도 24時間 以內에 病原菌은 寄主에 侵入을 完了하게 되므로 炭疽病 發生에 好適條件이 造成되면 迅速한 防除가 要求되며 豫防爲主의 事前防除가 優先되어야 하며 앞으로 本病에 대한 抵抗性 機作 研究의 一環으로 電子顯微鏡을 利用한 더 仔細한 解剖學的 研究도 遂行되어야 할 것이다.

參 考 文 獻

1. BERLYN G. P. & MIKSCH, J. P. (1976). *Botanical microtechnique and cytochemistry*. The Iowa State University Press. Ames, Iowa 326pp.
2. BINYAMINI, N. & SCHIFFMANN-NADEL, M. (1972). Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology* 62: 592-594.
3. CHANG, S. H. (1985). Studies on the varietal resistance and etiology of pepper anthracnose fungus caused by *Colletotrichum dematium* Grove. Chung-Buk Nat'l University. M. S. thesis.
4. CHUNG, B. K. (1969). An investigation of penetration structure by the soybean anthracnose fungus, *Glomerella glycines*. *Korean J. Plant Prot.* 8:25-28.
5. DAYKIN, M. E. & MILHOLLAND, R. D. (1984). Histopathology of ripe rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on muscadine grape. *Phytopathology* 74: 1339-1341.
6. KIM, M. H. (1968). Studies on the change of chemical components in apple fruits and the outbreak of bitter rot of apple. *Korean J. Plant Prot.* 4(2): 1-14.
7. LYNNE, L. KO, W. H. & KUNIMOTO, R. K. (1973). A microsyringe method for determining concentration of fungal propagules. *Phytopathology* 63: 1206-1207.
8. MILHOLLAND, R. D. (1982). Histopathology of strawberry infected with *Colletotrichum fragariae*. *Phytopathology* 72: 1434-1439
9. PANIGRAHI, C. & NARAIN, A. (1971). Effect of certain carbohydrates on pathogenesis of *Colletotrichum capsici* causing anthracnose of chillies. *Indian Phytopathol.* 23: 658-666
10. ROBERT, D. R. (1966). A rapid staining method giving sharp nuclear definition in frozen sections. *J. Med. Lab. Tech.* 23, 119-120.
11. ROBERT, R. G. & SNOW, J. P. (1984). Histopathology of cotton boll rot caused by *Colletotrichum capsici*. *Phytopathology* 74: 390-397
12. SHIPTON, W. A. & BROWN, J. F. (1962). A whole-leaf clearing and staining technique to demonstrate host-pathogen relationship in wheat stem rust. *Phytopathology* 52:1313.