

고추 역병균(*Phytophthora capsici*)의 액체배지에서 난포자 형성과 발아

김병섭^{1*} · Ernest James Rin² · Michael D. Coffey²

¹강릉원주대학교 식물생명과학과, ²캘리포니아대학교 식물병리학과

Oospore Production in Broth Media and Oospore Germination of *Phytophthora capsici*

Byung Sup Kim^{1*}, Ernest James Rin² and Michael D. Coffey²

¹Department of Plant Science, Kangnung-Wonju National University, Gangneung, Korea 210-702

²Department of Plant Pathology and Microbiology, University of California, Riverside, USA

(Received May 27, 2009. Accepted June 10, 2009)

ABSTRACT: In this study, we selected suitable broth media for mass production of *Phytophthora capsici* oospore, investigated oospore germination and secured F_1 progeny. Carrot broth and V8C broth were determined most effective for oospore formation by calculating and comparing oospore concentration produced from 8 different liquid media. Eleven strains were selected from *P. capsici* (CapA)/*P. tropicalis* (CapB) and 9 crosses were formed. Oospore progeny were produced, isolated and germinated from A1 and A2 combinations of *P. capsici* (CapA) with *P. tropicalis* (CapB). This resulted in a total number of 129 F_1 isolates of *P. capsici*/*P. tropicalis* with a 0.64-4.0% (mean 1.85%) oospore germination.

KEYWORDS: Broth media, F_1 progeny, Oospore formation and germination, *Phytophthora capsici*

고추 역병균(*Phytophthora capsici*)은 Leonian (1922)이 처음으로 고추(*Capsicum annuum* L.)에 역병을 일으키는 것으로 보고한 이후 이 병원균은 가지 열매, 목화, 토마토, 후추, cacao 등 50종이상의 식물에 병을 일으키는 것으로 보고되었다(Erwin and Ribeiro, 1996; 지 등, 2000). *P. capsici*는 A1 및 A2의 교배형을 가지는 이형접합균(heterothallic)으로 *Phytophthora*속 중 유주자낭의 돌출이 뚜렷하고 탈락성이 높고 긴 균사자루(pedicel)를 가지고 탈락되며, 난포자 형성은 장정기가 장난기를 관통하여 장정기가 장난기를 싸고 있는 형태로 보이는 저착성(amphigynous)인 group II에 속하는 것으로 보고되었다(Waterhouse, 1963).

Oudemans and Coffey(1991)는 여러 나라로부터 분리한 84균주의 *P. capsici*의 isozyme 분석결과 CAP1, CAP2, CAP3의 3개의 subgroups로 분류하였으며, Mchau and Coffey(1995)는 다시 isozyme에 따라 CapA와 CapB의 2개의 subpopulations으로 *P. capsici*를 분류하였다. 그러나 Uchida and Aragaki(2001)는 Hawaii의 열대작물인 후추, cacao, papaya, macadamia 및 고무나무에서 분리한 역병균 즉 Mchau and Coffey(1995)가 CapB로 분류하였던 역병균을 새로운 종으로 분리하여 *P. tropicalis*로 명명하였다. 그러나 Bowers et al.(2007)은 충분한 data가 있기 전에 *P. capsici*에서 *P.*

*tropicalis*를 분리하는 것을 삼갈 것을 제안했지만, 최근에 Donahoo and Lamour(2008)는 이들 2종의 교배를 통하여 별도의 종으로 분리를 주장했다.

역병균의 난포자는 일반적으로 생존하기 불리한 토양환경 조건에서 생존할 수 있는 내구성인 포자이다(Honour and Tsao, 1974). 또 난포자는 역병균 집단에서 유전적 다양성을 높이는 중요한 기구이기도 하다(Linde et al., 2001). 따라서 역병균의 병원성 분화, 유성생식을 통한 F_1 progeny의 유전연구 등을 하기 위해서는 많은 양의 난포자를 생산하는 것이 필요하다. 특히 균사가 없는 순수한 난포자(mycelium-free oospores)를 생산하는 것이 필요하다. Agar 배지에서 난포자를 형성하면 난포자를 순수분리할 때 agar조각이 난포자에 붙어 순수분리가 어렵기 때문에 액체배지에서 배양하는 것이 유리하다(Erwin and Ribeiro, 1996). Honour and Tsao(1974)는 *P. parasitica*를 V8-CaCO₃ 액체배지에 배양으로 후막포자 및 포자낭포자가 없는 난포자를 형성하였고, 액체배지가 역병균의 생장과 포자형성을 위한 균일한 영양과 생리적 환경을 제공한다고 보고한 바가 있다.

따라서 본 연구는 *P. capsici*의 병원성 분화와 유전연구를 위한 난포자를 확보하기 위하여 난포자 형성을 위한 우수한 액체 배지를 선발하였다. 또 액체배지에서 형성된 난포자의 발아율을 조사하였다.

공시균주로서 University of California, Riverside의 식물병

*Corresponding author <E-mail: bskim@nukw.ac.kr>

Table 1. List of *Phytophthora capsici* isolates used for this study

Isolate ^a	Mating type	Isozyme ^b subgroup	Host	Country (State)
P3778	A1	CapA	<i>Piper nigrum</i>	Indonesia
P6536	A1	CapA	Capsicum	New Mexico
P6007	A1	CapB	<i>Theobroma cacao</i>	Brazil
P7473	A1	CapA	Capsicum	Pakistan
P6874	A1	CapA	Capsicum	Costa Rica
P6741	A1	CapA	Capsicum	Korea
P15130	A1	CapB	<i>Theobroma cacao</i>	Brazil
P15128	A1	CapB	<i>Theobroma cacao</i>	Brazil
P0412	A1	CapB	<i>Piper nigrum</i>	Guatemala
P0561	A2	CapB	<i>Piper nigrum</i>	Brazil
P0575	A2	CapB	<i>Theobroma cacao</i>	Mexico
P1319	A2	CapA	Capsicum	California
P0623	A2	CapB	<i>Theobroma cacao</i>	Brazil
P6907	A2	CapA	Soil, <i>Caesalpinia</i>	Brazil
P15102	A2	CapA	Capsicum	Korea
P15103	A2	CapA	Capsicum	Korea

^aAll cultures from University of California, Riverside.

^bIsozyme subpopulations in *P. capsici* according to Mchau and Coffey (1995).

리학과에 저장중인 균주로 Mchau and Coffey(1995)에 의하여 분류된 CapA형 7균주와 CapB형 6균주를 사용하였다(Table 1). 난포자 형성을 조사하기 위한 액체 배지로 oatmeal broth(50 g oats를 1,000 ml 증류수에 넣고 40분간 2회 멸균 후 1 mm mesh로 거른 후 최종 1,000 ml가 되도록 증류수를 넣고 멸균), pea broth와 lima bean broth(pea 혹은 lima bean 150 g을 300 ml 증류수에 넣고 15분간 끓인 후 침출수에 4 g sucrose, 1 g asparagine, 0.5 g methionine, 50 mg beta sitosterol을 넣고 최종 500 ml이 되도록 증류수를 넣어 멸균), rye broth(rye seed 120 g을 증류수 1,000 ml에 넣고 30분

간 2회 멸균한 후 1 mm 강철 mesh로 거른 후 최종 1,000 ml가 되도록 증류수를 넣어 멸균), carrot broth(fresh carrot 200 g에 증류수 500 ml을 넣고 분쇄한 후 4겹 cheesecloth로 걸러낸 액을 최종 1,000 ml가 되도록 증류수를 넣고 멸균), tomato broth(tomato juice 100 ml에 900 ml 증류수를 넣어 멸균), V8C broth(7,000 rpm으로 원심분리한 V8 juice 상층액 330 ml, CaCO₃ 5 g, D.W. 670 ml)를 이용하였다.

본 연구에서는 식물 자체를 이용한 organic media에서 배양 방법은 60 × 20 mm Petri dish에 각각의 액체배지 16 ml을 넣고 V8C agar에서 7일간 배양된 균주 중 A1과 A2균주의 직경 8 mm 균총조각을 넣은 후 18°C 암상태로 14일간 배양하였다.

배양된 균사체로부터 난포자를 분리하기 위하여 blender (Waring blender)의 최고 속도로 1분간 마쇄한 후 혈구계를 이용하여 Petri dish(60 × 20 mm)당 난포자 형성량을 조사하였다. 조사한 5개 각 조합에서 pea broth, lima bean broth, tomato broth는 난포자 형성이 전혀 안되거나 적게 형성되었다. Oatmeal broth와 rye broth는 2 × 10⁴ - 236 × 10⁴/plate을 형성하였고 carrot broth와 V8C broth는 24 × 10⁴ - 220 × 10⁴/plate으로 비교적 많은 난포자를 형성하였다(Table 2).

난포자 발아를 통한 F₁ progeny를 얻기 위하여 난포자 형성이 우수했던 carrot juice broth에 서로 다른 교배형의 *P. capsici*(CapA)과 *P. tropicalis*(CapB)을 접종하여 18°C 배양기에 암상태로 30일이상 배양하여 난포자를 형성시켰다(Fig. 1). 순수한 난포자를 얻기 위하여 액체 배양한 균체를 blender로 1분간 마쇄한 후 100 micron nylon mesh로 걸러서 균사를 제거하고 2% water agar(ampicillin 60 ppm, rifampicin 20 ppm 첨가)에 5 × 10⁴/ml으로 조정된 난포자 현탁액 0.1 ml을 넣고 도말병으로 도말하였다. 헤부현미경(80배 시야)을 이용하여 난포자를 단포자 분리하여 항생제(ampicillin 60 ppm, rifampicin 20 ppm 첨가)가 첨가된 V8C agar에 Petri plate 당 32개의 난포자를 치상한 후 실온(20-25°C)에서 3일간 배양한 후 발아율을 구하였고, F₁ progeny는 발아하여 형성된 균총의 가장자리를 떼어 내어 순수분리하였다.

Table 2. Oospore formation of *Phytophthora capsici* according to crossing A1 and A2 mating type isolates with several liquid media

Cross	Oatmeal broth	Pea broth	Lima bean broth	Rye broth	Carrot broth	Tomato broth	V8C broth
P6741x	++ ^a			++	+++		+++
P15102	(49 × 10 ⁴)	-	-	(48 × 10 ⁴)	(170 × 10 ⁴)	-	(220 × 10 ⁴)
P6536x	++			+++	++		+++
P0561	(17 × 10 ⁴)	-	-	(105 × 10 ⁴)	(46 × 10 ⁴)	-	(215 × 10 ⁴)
P6874x	+			+	++		++
P0575	(2 × 10 ⁴)	-	-	(8 × 10 ⁴)	(61 × 10 ⁴)	-	(24 × 10 ⁴)
P0412x	++			+++	+++	+	+++
P15103	(36 × 10 ⁴)	-	-	(130 × 10 ⁴)	(193 × 10 ⁴)	(7 × 10 ⁴)	(178 × 10 ⁴)
P7473x	+++			+++	+++	+	+++
P1319	(102 × 10 ⁴)	-	-	(236 × 10 ⁴)	(139 × 10 ⁴)	(6 × 10 ³)	(148 × 10 ⁴)

^a:- no formation, +: low formation, ++: moderate formaton, +++: many formation.

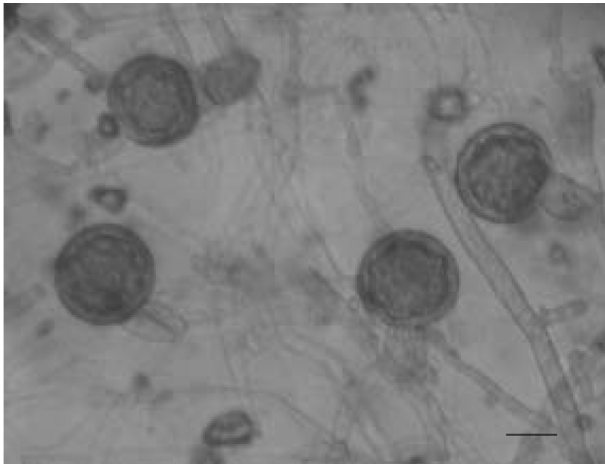


Fig. 1. Oospore formation of *Phytophthora capsici* in carrot broth. Bar size = 10 μ m.

Table 3. F_1 hybrid progeny from oospore germination of *Phytophthora capsici*

Cross	No. of F_1 hybrid Progeny	Oospore germination (%) ^a
P6874xP0575	24	2.0
P6536xP0561	18	1.25
P6536xP0575	11	1.89
P3778xP0623	57	5.0
P6007xP1319	8	0.78
P15128xP1319	3	0.64
P15130xP1319	3	4.0
P15130xP15102	1	1.08
P15128xP15102	4	-
Total	129	Mean 1.85

^aOospore germination was examined to 100-200 oospores on water agar plate.

서로 다른 9개 조합의 *P. capsici*(CapA)과 *P. tropicalis* (CapB) 교배형 교배에서 얻은 발아된 난포자로부터 얻은 F_1 hybrid progeny는 총 129 균주를 얻었으며 난포자의 발아율은 0.64-4.0%(평균 1.85%)로 비교적 낮게 나타났다(Table 3). 본 연구를 통하여 얻은 *P. capsici*(CapA)과 *P. tropicalis*(CapB) 사이의 F_1 hybrid progeny는 유전분석을 통하여 F_1 hybrid progeny임이 확인되었다(이 논문에 자료 미 기록). 이러한 F_1 hybrid progeny는 병원성 분화에 대한 연구를 위한 중요한 재료이며 *P. capsici*/*P. tropicalis*의 종 확정 연구에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

적요

본 연구는 *P. capsici*의 난포자를 다량으로 확보하기 위하여 우수한 액체 배지를 선발하고 난포자의 발아율을 조사할 뿐만 아니라 F_1 progeny를 확보하기 위하여 수행하였다. 공시한 8개 액체배지 중 carrot broth와 V8C broth가 난포자 형성을 위해 가장 적당한 배지였다. 총 11균주의 *P. capsici* (CapA형)과 *P. tropicalis*(CapB형)를 선발하였고 *P. capsici* (CapA형)에 *P. tropicalis*(CapB형)을 교배하는 서로 다른 9개 조합의 교배에서 얻은 난포자로부터 총 129 균주의 F_1 hybrid progeny를 얻었으며 난포자의 발아율은 0.64-4.0%(평균 1.85%)이었다.

감사의 말씀

이 논문은 2007년도 강릉대학교 장기해외과건연구지원에 의해서 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

지형진, 조원대, 김충희. 2000. 한국의 식물역병. 농촌진흥청 농업과학기술원. 226pp.

Aragaki, M. and Uchida, J. Y. 2001. Morphological distinctions between *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* sp. Nov. *Mycologia* 93:137-145.

Bowers, J. H., Martin, F. N., Tooley, P. W., and Luz, E. D. M. N. 2007. Genetic and morphological diversity of temperate and tropical isolates of *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 97:492-503.

Donahoo, R. S. and Lamour, K. H. 2008. Interspecific hybridization and apomixis between *Phytophthora capsici* and *Phytophthora tropicalis*. *Mycologia* 100:911-920.

Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora Disease Worldwide*. APS, 562 pp.

Honour, R. C. and Tsao, P. H. 1974. Production of oospores by *Phytophthora parasitica* in liquid medium. *Mycologia* 66: 1030-1038.

Leonian, L. H. 1922. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 12:401-408.

Linde, C., Soo, S. H. and Drenth, A. 2001. Sexual recombination in *Phytophthora cinnamomi* *in vitro* and aggressiveness of single-oospore progeny to Eucalyptus. *Plant Pathol.* 50:97-102.

Mchau, G. R. A. and Coffey, M. D. 1995. Evidence for the existence of two subpopulations in *Phytophthora capsici* and a redescription of the species. *Mycol. Res.* 99:89-102.

Oudemans, P. and Coffey, M. D. 1991. Isozyme comparison within and among worldwide sources of three morphologically distinct species of *Phytophthora*. *Mycol. Res.* 95:19-30.

Waterhouse, G. M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycol. Pap.* 92. 22pp. Commonw. Mycol. Inst. Kew. UK.