

## *Paraconiothyrium minitans* CM2의 상추균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor*) 균핵 발아에 대한 억제 효과

이상엽<sup>1\*</sup> · 김완규<sup>1</sup> · 홍성기<sup>2</sup> · 원함연<sup>1</sup> · 박경석<sup>1</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물팀, <sup>2</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 작물보호과

### Inhibitory Effect of *Paraconiothyrium minitans* CM2 on Sclerotial Germination of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* Causing Sclerotinia Rot of Lettuce

Sang Yeob Lee<sup>1\*</sup>, Wan Gyu Kim<sup>1</sup>, Sung Kee Hong<sup>2</sup>, Hang Yeon Weon<sup>1</sup> and Kyungseok Park<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Agricultural Microbiology Team, National Academy of Agricultural Science (NAAS), Rural Development Administration (RDA), Suwon 441-707, Korea

<sup>2</sup>Crop Protection Division, NAAS, RDA, Suwon 441-707, Korea

(Received 20, July 2011., Accepted 25, July 2011)

**ABSTRACT** : One fungal isolate CM2 parasitic to *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* causing Sclerotinia rot of lettuce was identified as *Paraconiothyrium minitans* based on its morphological and molecular characteristics. *P. minitans* CM2 grew best on PDA with pH 6.5 at 22°C under alternating cycles of 12 hr near ultraviolet light and 12 hr darkness. Sclerotia of *S. sclerotiorum* and *S. minor* treated with conidial suspension of *P. minitans* CM2 did not directly germinate and produced no apothecia.

**KEYWORDS** : Inhibitory effect, *Paraconiothyrium minitans*, Sclerotial germination, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*

## 서 론

유기합성 농약은 화학비료와 함께 1920년 이후 사용되어 식량 수요의 해결에 핵심적인 역할을 해왔다. 그러나 작물의 병해충 방제를 위해 화학농약을 지속적으로 사용해온 결과, 건전한 농업생태계의 파괴와 사용되는 농약에 저항성을 가진 식물병원균의 출현으로 문제가 되어 새로운 개념의 농약을 개발하고, 사용하려는 노력이 전 세계적으로 시도되고 있다(Tanaka and Omura, 1993; Russell *et al.*, 1995). 또한 최근에는 소비자의 안전 농산물에 대한 욕구가 증가되어 저농약 또는 무농약 농법으로 재배한 채소류가 높은 가격으로 시장에서 거래되고 있는 실정으므로 이에 상응하여 유용미생물을 이용한 작물병의 환경친화적인 생물학적 방제법 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이러한 결과로서 세계적으로 병해충과 잡초방제에 사용되는 미생물농약은 149종이 등록되어 사용되고 있으며(Copping, 2009), 미생물농약의 사용량은 화학농약 사용량의 약 1%에 불과하나, 환경오염 및 병원균의 저항성에 대한 방지 대책으로서의 역할이 기대되고 있다(Fravel, 2005).

작물에 발생하고 있는 주요 토양전염성 병원균으로는

*Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia* spp. 등이 알려져 있고, 이들 병원균은 경제적으로 큰 피해를 입히는 주요 병원균들이다(Parker *et al.*, 1985). 작물의 토양전염병 발생을 억제하는 생물적 요인으로는 여러 가지가 알려져 있으나, 주로 근권미생물 또는 토양미생물인 *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Chromobacterium* spp., *Trichoderma* spp. 등이 관여하는 것으로 보고되었다(Hornby, 1990). 국내에서 시설 재배 채소의 재배중에 발생하여 피해를 일으키는 토양전염성 병종의 하나인 균핵병은 전세계의 온대와 아온대지역에 널리 분포하며, 이 병에 의한 작물의 피해가 수백만 달러에 이르는 것으로 보고되어 있다(Ting Zhou and Greg, 1998). 균핵병은 작물의 유포기 뿐만 아니라 수확기까지도 발생하며, 연작으로 인한 토양 내 병원균의 밀도 증가와 병원균이 자연 상태에서 장기간 생존할 수 있는 균핵을 형성하기 때문에 이 병이 한번 발생한 포장에서는 방제가 매우 어려운 실정이다. 따라서 본 연구에서는 국내의 시설재배 작물인 상추에 발생하여 문제가 되고 있는 균핵병에 대한 생물적 방제제를 개발하기 위하여 상추균핵병균에 기생하는 균주를 토양으로부터 분리하여 동정하고, 상추균핵병균의 균핵에 대한 발아 억제효과를 조사하였다.

\*Corresponding author <E-mail : lsy1111@korea.kr>

## 재료 및 방법

### 선발균주(CM2)의 형태적 특성 조사

국내에서 상추균핵병의 원인균으로 알려진(Kim and Cho, 2002) *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary와 *S. minor* Jagger에 기생하는 토양분리 진균 중에서 최종 선발된 균주(CM2)에 대한 형태적 특성을 조사하기 위하여 공시균주를 감자설탕한천배지(PDA)에 이식 후 22°C의 항온기에서 20일간 배양한 다음, 형성된 균총을 관찰하고, 배양기에 형성된 자실체를 분리하여 현미경으로 관찰하였다.

### CM2의 분자적 특성 조사

공시균주의 ribosomal DNA-internal transcribed spacer (ITS) 부위의 염기서열 분석을 실시하였다. CM2는 potato dextrose broth에 7일간 배양하여 동결건조하고 마쇄한 후, DNeasy kit (QIAGEN, Germany)를 사용하여 Genomic DNA를 추출하였다. ITS 부위의 증폭을 위해 ITS1 과 ITS4 프라이머가 사용되었고, PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 predenaturation, 94°C에서 50초 denaturation, 52°C에서 90초 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 30회 반복하였고, 최종적으로 72°C에서 7분간 post extension하였다. 증폭된 PCR 산물은 Gel extraction kit (Bioneer)를 사용하여 순화 후 염기서열을 분석하였다. 계통수를 작성하기 위해 CM2의 염기서열 뿐만 아니라, 형태적으로 동정하여 유사한 균으로 추정되는 GenBank에 등록된 *Coniothyrium* spp.와 *Paraconiothyrium* spp. 등 다른 종들의 ITS 염기서열을 사용하여 분석하였다. 염기서열은 DNASTAR 프로그램의 seqman을 사용하여 편집하고, CLUSTAL W 분석법(Thompson 등, 1994)을 사용하여 정렬하였다. 정렬된 염기서열은 Mega 5.0 (Tamura 등, 2011) 프로그램을 사용하여 Neighbor-Joining (NJ)법으로 분석하였고, 분류군간 sequence distance는 Kimura-2 parameter법으로 계산되었고, Bootstrap 분석이 수행되었다.

### CM2의 배양적 특성 조사

공시균주의 균사생육에 적합한 온도범위를 조사하기 위하여 PDA에서 배양한 균총을 직경 5 mm 코르크보러로 떼어내어 직경 88 mm의 페트리디쉬 PDA에 옮긴 다음, 온도가 5, 10, 15, 20, 22, 25, 28, 30, 32, 35°C로 조절된 항온기에서 3반복으로 처리하여 10일간 배양 후 균총의 직경을 측정하였다.

공시균주의 균사생육에 적합한 pH범위를 조사하기 위하여, pH 4.0부터 0.5간격으로 9.0까지 조절한 직경 88 mm의 페트리디쉬 PDA에 온도실험에서와 같이 균총을 옮긴 다음, 20°C 항온기에서 10일간 배양 후 균총의 직경을 측정하였다.

광이 공시균주의 균사생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 직경 88 mm의 페트리디쉬에 분주한 PDA배지를 이용하여 온도실험에서와 같이 균총을 옮긴 다음, 암조건, 20W의

형광등 또한 근자외선등(near ultraviolet light)이 1일에 12시간 주기로 비추는 조건으로 구분하여 20°C 항온기에서 10일간 배양 후 균사생장의 길이를 측정하였다.

공시균주의 균사생육에 적합한 배지종류를 찾기 위하여, PDA(Potato powder 39 g, Dextrose 20 g, agar 15 g), v8juice agar (v8juice 200 ml, CaCO<sub>3</sub> 3 g, agar 20 g), czapek dox agar(NaNO<sub>3</sub> 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, KCl 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> 0.01 g, Sucrose 30 g, agar 20 g), malt extract agar(malt extract 20 g, Sucrose 20 g, agar 20 g), corn meal agar(corn meal 17 g, agar 20 g)와 oat meal agar(corn meal 17 g, agar 20 g)에 온도실험에서와 같이 균총을 옮긴 다음, 3반복으로 처리하여 20°C 항온기에서 암조건으로 10일간 배양 후 균사생장의 길이를 측정하였다. 모든 배양적 특성 조사 실험은 3반복으로 실시되었다.

### 상추균핵병균 균핵 발아에 대한 CM2의 억제효과 조사

공시균주가 상추균핵병균(*S. sclerotiorum*과 *S. minor*)의 균핵 발아에 미치는 영향을 조사하기 위하여 공시균주를 보리쌀배지(보리쌀 100 g/삼각플라스크 500 ml)에 이식 후 20°C 항온기에서 10일간 배양한 다음, 형성된 분생포자를 현탁하여 분생포자현탁액(농도 :  $1 \times 10^7$ /ml)을 제조하였다. 공시균주의 분생포자현탁액에 상추균핵병균의 균핵을 30분간 침지한 다음, 직경 88 mm의 페트리디쉬에 분주한 물한천배지(WA)에 일정한 간격으로 10개씩 3반복으로 치상하여 20°C 항온기에서 8일간 배양한 다음, 균핵의 직접 발아 여부를 조사하고, 배양 15일 후에 공시균주의 균핵에 대한 감염 여부를 조사하였다. 또한 공시균주의 분생포자현탁액에 30분간 침지한 균핵을 500 ml 삼각플라스크의 모래배지에 10개씩 3반복으로 치상 후 형광등이 1일에 12시간 주기로 비추이는 항온기에서 76일간 배양 후 자낭반의 형성 여부를 조사하였다.

## 결과 및 고찰

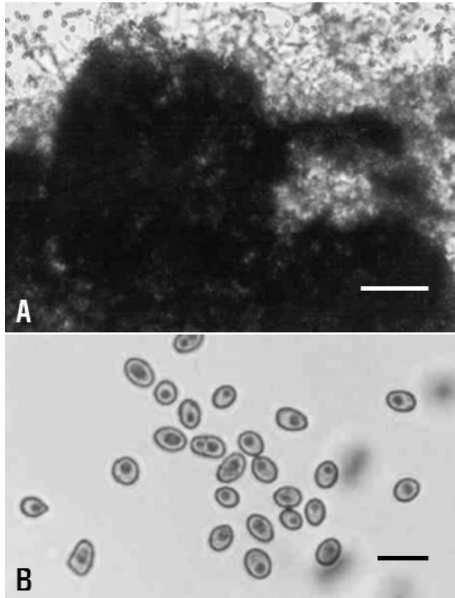
### 선발균주(CM2)의 동정

상추에 균핵병을 일으키는 2종의 진균(*Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor*)에 기생하는 선발균주(CM2)에 대한 형태적 특성을 조사한 결과, *Coniothyrium minitans* Campbell로 동정되었다(Table 1, Fig. 1). 본 연구에서 분리하여 동정한 *C. minitans*의 형태적 및 배양적 특성은 Punithalingam (1982)이 기술한 특성과 비슷하였다.

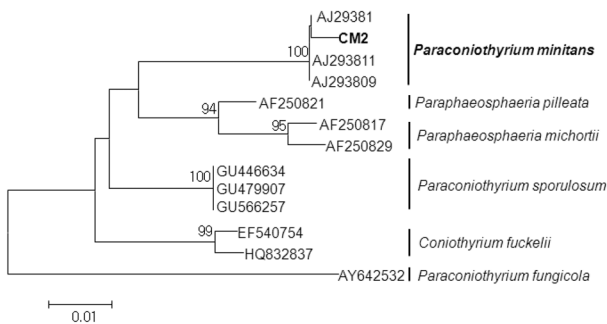
형태적 특성에 의해 *C. minitans*로 동정된 CM2를 분자적으로 확인하기 위해 CM2의 ITS 염기서열뿐만 아니라 GenBank에서 얻어진 *Coniothyrium* spp. *Paraphaeosphaeria* spp. 및 *Paraconiothyrium* spp.을 포함하여 13개의 ITS 염기서열을 비교, 분석하고, Neighbour-joining tree를 작성하였다(Fig. 2). CM2는 GenBank에 등록된 3개의 균 기생성 *C. minitans* 균주 (CBS 641-80, CBS 859-71, IMI 134523)들과

**Table 1.** Identification of *Coniothyrium minitans* CM2, a parasitic fungus selected for biological control of lettuce sclerotinia rot

Structure examined	Morphological characteristics	
	Present isolate	Punithalingam (1982)
Pycnidium	Brown to black, globose to subglobose, 200-600 µm in diameter	Brown to black, globose to subglobose, 150-600 µm in diameter
Conidium	Dark brown, globose to ellipsoid, 3.5-7.5 × 3.0-5.0 µm	Dark brown, globose to ellipsoid, 4.0-7.0 × 2.5-3.5 µm



**Fig. 1.** Morphological features of *Coniothyrium minitans* CM2. A, pycnidia and conidia (scale bar = 100 µm); B, conidia (scale bar = 10 µm).



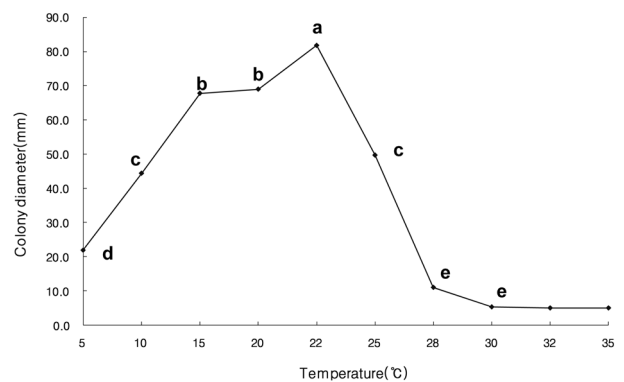
**Fig. 2.** Neighbor-joining tree based on sequences of rDNA-ITS regions of *Paraconiothyrium minitans* CM2 and related species. The numbers above the nodes represent bootstrap values of > 60% out of 1,000 bootstrap replication. Bar represents the number of nucleotide substitutions per site.

99%의 상동성을 나타냈으며, 계통수에서도 같은 Clade에 속하였고, 100%의 bootstrap값으로 지지되었다. 그러나 Verkley 등(2004)은 분자적 연구를 통하여 균 기생성 *C. minitans*를 새로운 속인 *Paraconiothyrium*에 소속시켰다. 따라서 *C. minitans*는 *Paraconiothyrium minitans* (W. A. Campb.) Verkley의 이명이며, 저자들의 선발균주인 CM2는 ITS 염기서열을 기초로 *P. minitans*로 동정되었다(Fig. 2).

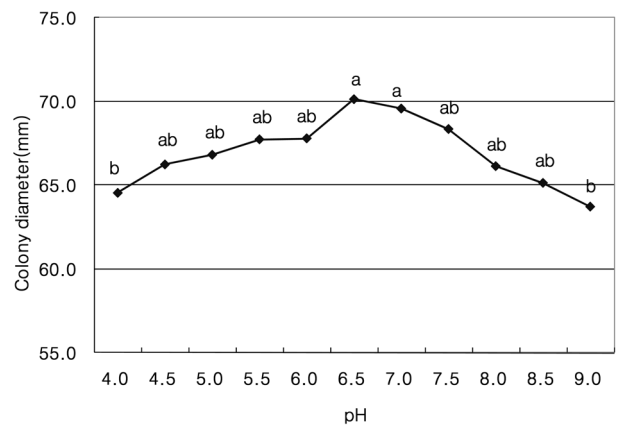
CM2는 GenBank에 등록된 *C. minitans* 균주들과는 2개의 염기서열에서 차이를 나타냄으로서 기존에 보고된 균주와 동일 균주가 아니라 국내에서 분리된 새로운 계통의 균주라는 것이 확인되었다.

***Paraconiothyrium minitans* CM2의 배양적 특성**

*P. minitans* CM2의 균사생육 온도범위를 조사한 결과, 5~28°C였으며, 균사생육 최적온도는 22°C이었다(Fig. 3). 상추균핵병균의 균사생육 적온이 20~22°C로 알려져 있어 이 선발균주의 균사생육 적온과 비슷하므로 균핵병균의 생육 억제에 매우 효과적일 것으로 생각된다. 또한 선발균주의 균사생육이 가능한 pH 범위를 조사한 결과, pH 4.0~9.0 이고, 최적 pH는 6.5였다(Fig. 4). 광이 *P. minitans* CM2의



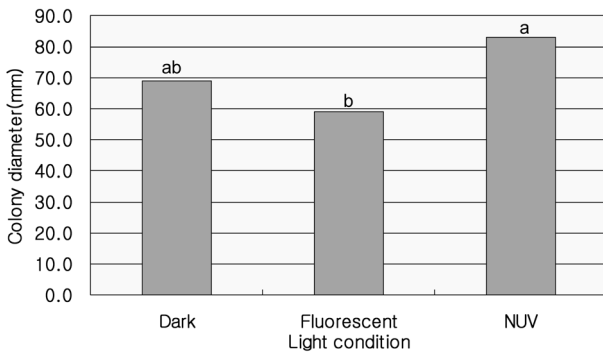
**Fig. 3.** Effect of temperature on mycelial growth of *Paraconiothyrium minitans* CM2 on PDA.



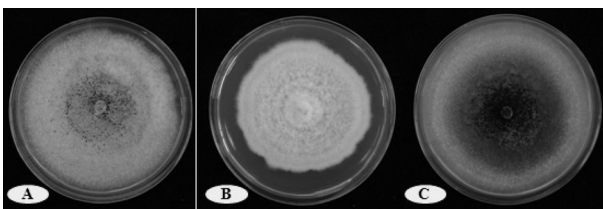
**Fig. 4.** Mycelial growth of *Paraconiothyrium minitans* CM2 on PDA with different pH at 20°C.

균사생장에 미치는 배양조건을 조사한 결과, 근자의선광 처리구가 암배양이나 형광등 처리구보다 균사생장에 가장 효과적이었다(Fig. 5, Fig. 6). 선발균주의 배지종류별 균사생장을 조사한 결과, PDA, malt extract agar, V8 juice agar, oat meal agar, corn meal agar, Czapek dox agar의 순으로 균사생장이 좋았다(Fig. 7). 이상과 같이 *P. minitans* CM2에 대한 배양적 특성을 조사한 결과, 최적 균사 배양 조건은 pH 6.5로 조절한 PDA배지를 사용하고, 22°C에서 근자의선광을 처리하여 배양하는 것이 가장 효과적인 것으로 나타났다.

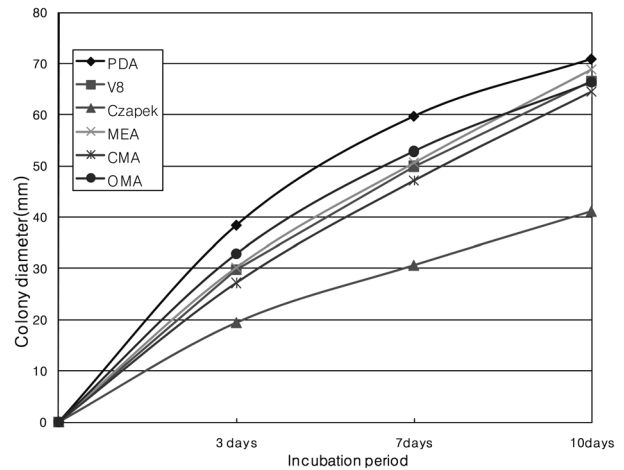
한편 McQuilken 등(1997)의 보고에 의하면 *C. minitans* (*P. minitans*의 이명)의 균사생육 온도범위는 4~25°C, 균사생육 최적온도는 20~25°C, 균사생육 pH 범위는 3~9, 균사생육 최적 pH는 4~6였다. 또한 PDA와 MEA 배지가 포자발아, 병자각 형성 및 균사생장에 좋았으며, 형광등이



**Fig. 5.** Mycelial growth of *Paraconiothyrium minitans* CM2 on PDA at 20°C under alternating cycles of 12 hr fluorescent light or near ultraviolet light and 12 hr darkness.



**Fig. 6.** Effect of light for mycelial growth of *Coniothyrium minitans* CM2 on PDA at 20°C. A, Darkness; B, Fluorescent light; C, Near ultraviolet light.



**Fig. 7.** Mycelial growth of *Paraconiothyrium minitans* CM2 at different media at 20.

포자형성을 촉진하였으나 균 생장에는 영향을 없는 것으로 보고하였다. 따라서 CM2의 배양적 특성은 McQuilken 등 (1997)이 보고한 *C. minitans*의 배양적 특성과 매우 유사하였다.

***P. minitans* CM2의 상추균핵병균 균핵 발아에 미치는 영향**

*P. minitans* CM2의 분생포자현탁액을 처리 후 2종의 상추균핵병균(*S. sclerotiorum*, *S. minor*)의 균핵 발아를 조사한 결과, 처리된 균핵 모두 *P. minitans* CM2에 감염되어 균사가 자라나오는 직접 발아가 없었으며, 자낭반 형성도 전혀 이루어지지 않았다(Table 2, Fig 8). 이와 같이 균핵병균의 균핵에 *P. minitans* CM2 균주가 기생하게 되어 균핵병균 균핵의 직접 발아와 자낭반 형성이 억제됨으로서 이 선발균주는 상추포장에서 균핵병균의 전염원인 균핵의 활성을 억제하여 균핵병의 발생을 방제하는데 큰 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다.

*C. minitans*(*P. minitans*의 이명)는 1947년에 미국에서 발견된 후 유럽, 뉴질랜드, 중국, 러시아, 캐나다, 인도, 남아프리카 등 18개국에서도 발견되었으며, *Sclerotinia minor*;

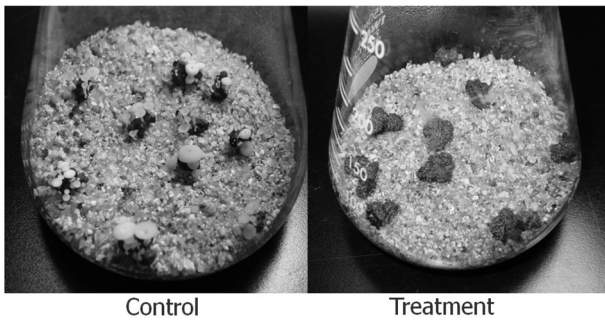
**Table 2.** Inhibition of sclerotial germination and apothecial formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* by treatment with conidial suspension ( $1 \times 10^7$ /ml) of *Paraconiothyrium minitans* CM2

<i>Sclerotinia</i> spp.	Conidial suspension	% germination of sclerotia <sup>a</sup>	% infected sclerotia <sup>b</sup>	% formation of apothecia <sup>c</sup>
<i>S. sclerotiorum</i>	Treated	0	100	0
	Non-treated	100	0	100
<i>S. minor</i>	Treated	0	100	0
	Non-treated	83.3	0	70

<sup>a</sup>Direct germination of sclerotia was examined after incubation on water agar at 20°C for eight days.

<sup>b</sup>Sclerotial infection with *P. minitans* CM2 was examined after incubation on water agar at 20°C for 15 days.

<sup>c</sup>Apothecial formation was examined after incubation on sand media at 15 under alternating cycles of 12 hr near ultraviolet light and 12 hr darkness for 76 days.



**Fig. 8.** Inhibition of apothecial formation from sclerotia of *S. sclerotiorum* by treatment with *Paraconiothyrium minitans* CM2 on sand media at 15°C.

*S. sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *Botrytis cinerea*, *B. fabae*, *Sclerotium cepivorum*의 균핵에 기생하여 이들 병원균에 대한 생물학적 방제균으로서의 활용 가능성이 제시되었다 (Whipps *et al.* 1992). 이후 1997년에 독일의 Prophyta 회사에서 *C. minitans*를 재료로 한 균핵병 방제 미생물농약 (Contans® WG)을 등록하였으며, 이 균은 유럽과 북미에서도 미생물농약으로 등록되어 유채, 상추 등 각종 작물의 균핵병 방제에 사용되고 있다(Copping, 2009).

### 적요

2종의 상추균핵병균(*S. sclerotiorum*, *S. minor*)에 기생성인 선발진균(CM2)의 형태적 및 분자적 특성을 조사한 결과, *Paraconiothyrium minitans*로 동정되었다. *P. minitans* CM2의 균사 배양조건은 pH 6.5로 조절할 PDA배지를 사용하고, 22°C에서 1일 12시간 주기의 근자외선광을 처리하여 배양하는 것이 가장 좋은 것으로 나타났다. *P. minitans* CM2의 분생포자현탁액을 상추균핵병균의 균핵에 처리하여 발아에 미치는 영향을 조사한 결과, 균핵의 직접발아와 자낭반 형성이 전혀 이루어지지 않았다.

### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ0067412011)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- Copping L. G. 2009. The manual of biocontrol agents. Fourth edition. BCPC pp 851.
- Fravel. D. R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:337-359.
- Hornby, D. 1990. Biological control of soilborne plant pathogens. C.A.B International, Wallingford, Oxon, UK. pp 479.
- Kim, W. G. and Cho, W. D. 2002. Occurrence of *Sclerotinia* Rot on Composite Vegetable Crops and the Causal *Sclerotinia* spp. *Mycobiology* 30:41-46.
- McQuilken Mark P., Budge Simon P. and Whipps John M. 1997. Effects of culture media and environmental factors on conidial germination, pycnidial production and hyphal extension of *Coniothyrium minitans*. *Mycol. Res.* 101(1):11-17.
- Parker, C. A., Rovira, A. D., Moore, K.J., Wong, P. T. W. and Kollmorgen, J. F. 1985. Ecology and management of soilborne plant pathogens. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. pp. 358.
- Punithalingam, E. 1982. *Coniothyrium minitans*. CMI Descriptions of Pathogenic and Bacteria No. 732.
- Rusell, P. E., Milling, R. J. and Wright, K. 1995. Control of fungi pathogenic to plants. In fifty years of antimicrobials: past perspectives and future trends.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. doi: 10.1093/molbev/msr121.
- Tanaka, Y. T., Omura, S. 1993. Agroactive compounds of microbial origin. *Ann. Rev. Microbiol.* 47:57-87.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22:4673-4680.
- Ting Zhou and Greg J. B. 1998. Biological control strategies for *Sclerotinia* Diseases. 127-156. In : Plant-microbe interactions and biological control. Greg J. B., L. David K. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Verkley, G J. M., Silva, M. da, Wicklow, D. T. and Crous, P. W. 2004. *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. *Studies in Mycology* 50:323-335.
- Whipps J. M and Gerlagh M. 1992. Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycol. Res.* 96(11):897-907.