

## 먹물버섯의 키틴질 분해효소에 의한 식물병원균류의 생장억제

강유리 · 최형태\*

강원대학교 생화학과

### Growth Inhibition of Plant Pathogenic Fungi by a Chitinase of *Coprinellus congregatus*

Yuri Kang and Hyoung T. Choi\*

Department of Biochemistry, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Republic of Korea

(Received December 3, 2012 / Accepted December 17, 2012)

Experiments for growth inhibition of two different plant pathogenic fungal species, *Alternaria alternata* (KCTC26781) and *Fusarium graminearum* Z03639 (type culture) and ASR1R1 (isolate from rice), by a chitinase (Chi2) expressed in the autolysing tissue of *Coprinellus congregatus* were carried out. In liquid media, Chi2 (50 µg/ml) inhibited more than 90% of germination of *A. alternata* spore, and the growth of each fungal strain was totally inhibited by the addition of Chi2 at the concentrations of 70 µg/ml. When 6 µg of Chi2 was added twice a day at the hyphal tip zone, both strains of *F. graminearum* showed growth inhibition as well as decreased hyphal branching.

**Keywords:** *Alternaria alternata*, *Coprinellus congregatus*, *Fusarium graminearum* chitinase

진균류의 세포벽은 다양한 glucan과 10–20%의 키틴질(Chitin)로 구성되어 있다. Chitin은 N-acetyl-glucosamine이 중합된 고분자 화합물로서 자연계에 섬유질 다음으로 많이 존재한다. 진균류는 매우 다양한 대사과정을 가지는 것은 물론 인류수명의 연장과 함께 다양한 장기이식 및 여러 가지 이유로 면역력이 저하된 사람(Immunocompromised people)을 포함하여 건강한 사람에게까지 균류가 질병을 유발하는 것이 보고되면서 이들의 생장을 조절하는 항진균성 항생물질에 chitinase의 가능성에 대한 관심도 증가되고 있다. 세균(*Serratia*)의 chitinase를 대장균에 도입하고 발현시켜 항진균성을 확인하였고(Chung and Kim, 2007), 균류의 chitinase 유전자를 도입한 유전자 변형 레몬(*Distefano et al.*, 2008)과 완두콩(*Amian et al.*, 2011)이 다양한 진균류의 질병에 저항성을 보였다. 또한 동물병원성 진균류는 대부분이 이형태성(異形態性, dimorphism) 전환이 필수적인데 López-Matas 등 (2000)은 이형태성의 전환 시 chitin 함량이 변화가 있으며 chitin 양의 적절한 조절을 통하여 이형태성을 억제함으로써 병원성의 조절이 가능함을 시사하였다.

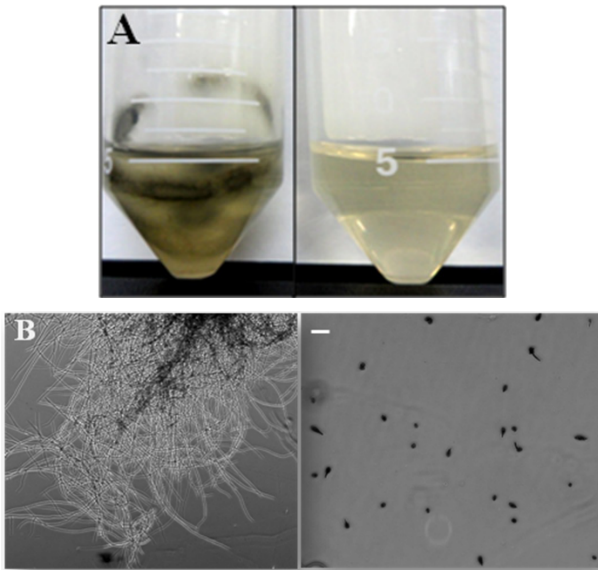
농작물에 막대한 피해를 초래하는 식물병원성 균류는 매우 다양하며, *Fusarium* 속의 균류, 특히 *F. graminearum*이 많은 농작물에 피해를 주며 이 균이 생성하는 독소(Jonker *et al.*, 2012)와 식물체가 이 균에 대항하는 관련 유전자의 발현에 대한 보고

(Gottwald *et al.*, 2012)가 있다. *Alternaria alternata*도 알레르기를 유발함과 동시에 식물에게 병을 유발한다(Zhao *et al.*, 2012).

먹물버섯의 한 종류인 *Coprinellus congregatus*는 버섯이 생성되고 성숙되면서 갓(pileus)이 먹물처럼 녹으며, 이때 조직세포의 세포벽이 자가분해된다(Choi and Cho, 2005). *C. congregatus*에서 chitinase 1 cDNA를 분리하고(Lim and Choi, 2009) 이를 효모균에 도입하여 효모균의 생장이 억제됨을 보고하였다(Lim and Choi, 2010). 또한 자가분해되는 자실체에서 새로운 chitinase cDNA (*chi2*)를 분리하고 이를 *Pichia pastoris*에서 발현하여 생성된 효소단백질이 exochitinase이며 그 생화학적 특성을 보고하였다(Kang *et al.*, 2012). 이 chitinase 2 (Chi2)가 식물병원성 균류의 생장을 억제하는가 분석하고자 *A. alternata* (KCTC26781)와 *F. graminearum* 표준균주(ZO3639) 및 벼에서 분리한 분리균주(ASR1R1) 등 3가지 균류에 대한 실험을 수행하였다.

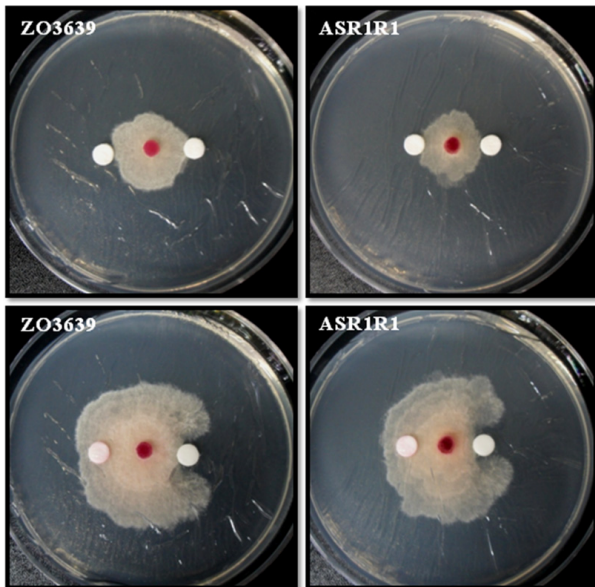
*A. alternata*의 포자를 얻기 위하여, 셀로판지를 올린 PDA배지에 균을 접종하고 25°C에서 3일 동안 배양하였다. Plate에 0.05% SDS 3 ml를 첨가하고, 멸균된 셀로판지 위에 덮인 포자를 긁어 모아 Millipore사의 filtration kit에 거름을 더하고 포자 현탁액을 여과하여 균사는 제거하고 포자만을 모았다. 포자 현탁액을 원심분리(8,000 rpm, 10 min) 방법으로 멸균된 증류수를 첨가하여 2회 세척하고 발아 억제 실험에 사용하였다. 플라스틱 50 ml 시험관에 농도의 Potato dextrose broth 3 ml를 넣고 포자 현탁액 2 ml (약  $5 \times 10^5$  spore/ml)를 접종한 후 정제된 Chi2 (Kang *et al.*, 2012)를 50 µg/ml 농도가 되도록 더했으며, 동일농

\*For correspondence. E-mail: htchoi@kangwon.ac.kr; Tel.: +82-33-250-8511; Fax: +82-33-242-0459

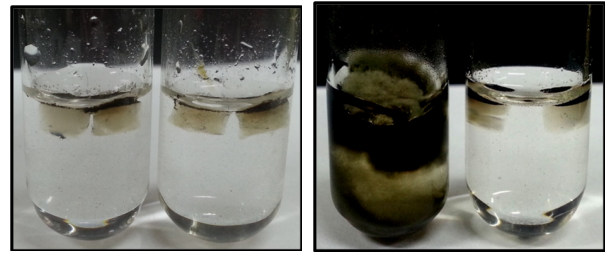


**Fig. 1.** (A) Inhibition of germination of *A. alternata* spore by Chi2 (50 µg/ml) in potato dextrose broth (PDB) for 24 h. Left, PDB with bovine serum albumin (BSA); right, PDB with Chi2. (B) Comparison of germination of BSA culture and Chi2 culture under the phase-contrast microscope. White bar at the right panel, 20 µm.

도의 bovine serum albumin을 대조구로 사용하였다. 이를 28°C에서 24시간 동안 진탕 배양하고 성장된 균체와 포자를 위상차 현미경으로 분석하였다. *A. alternata*의 균사가 정상적으로 발아된 대조구에 비하여 Chi2 (최종 농도 50 µg/ml)가 첨가된 액체배지에서는 포자의 발아가 현저하게 감소되어 균사체를 볼 수 없었



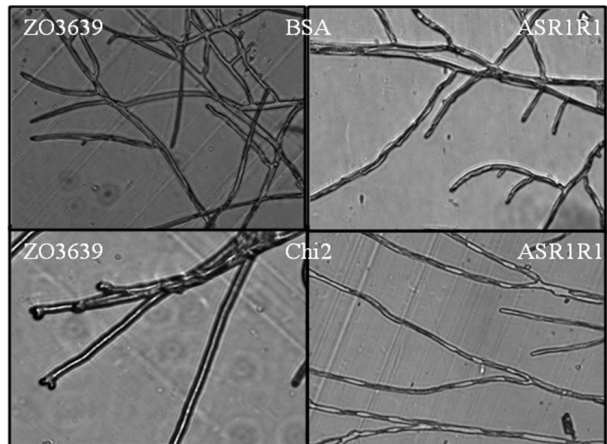
**Fig. 3.** Growth inhibition of *F. graminearum* ZO3639 (type culture) and ASR1R1 (isolate from rice) by Chi2 on PDA-cellophane plate. (Top) On day 2, BSA (left side filter paper) or Chi2 (right side filter paper) was added 6 µg × 2 per day. (Bottom) On day 4, mycelial growth was inhibited at the Chi2-added regions on both strains.



**Fig. 2.** Determination of growth inhibition by Chi2 of *A. alternata* after 0 h (left) and on day 6 (right). Left side tube, PDB plus BSA; right side tube, PDB plus Chi2 (70 µg/ml).

고(Fig. 1A), 현미경으로 확인한 결과 극히 일부(약 10% 이하)의 포자만 germ tube 형성 단계에 머물렀다(Fig. 1B). 동일한 배지 성분 (Chi2 농도, 70 µg/ml)을 cap tube에 더하고 한천배지에서 자란 *A. alternata* 균체조각을 2개씩 접종하고 동일조건으로 6일간 배양한 후 성장을 확인한 결과 Chi2 (70 µg/ml)가 이 균의 성장을 억제하는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

*F. graminearum* 2가지 균주를 대상으로 Chi2에 의한 억제 실험을 다음과 같이 수행하였다. 멸균된 셀로판지를 올린 PDA에 *F. graminearum* 표준균주 ZO3639와 분리균주 ASR1R1을 각각 접종한 후 25°C에서 2일 동안 배양하였다. 멸균된 여과지(지름 7 mm)를 균사체의 끝에 위치하고 하루에 2회 Chi2 (매번 6 µg) 또는 BSA (매번 6 µg)를 더하고 다시 2일 동안 동일조건에서 배양하여 성장억제를 확인하였다. BSA를 더한 지역에서는 생장에 변화가 없는 반면 Chi2를 더한 지역에서는 균사의 생장이 강하게 억제되었다(Fig. 3). BSA와 Chi2를 더한 지역의 균사를 위상차 현미경에서 확인한 결과 Chi2에 의하여 생장이 억제된 지역의 균사는 대조구에 비하여 균사의 branching이 상대적으로 감소하였다(Fig. 4). Chi2가 액체배양 조건에서 이 균들에 대한 성장 억제효과를 분석하고자 PDB 3 ml에 균체조각을 2개씩 접종하고 Chi2 (최종농도 70 µg/ml) 및 BSA를 더한 배지에서 6일 동안 진탕 배양하였다. BSA를 더한 배지와 달리 Chi2를 더한 액체배지에서는 *F. graminearum* 두 가지 균주 모두 전혀 성장을 보



**Fig. 4.** Hyphae of *F. graminearum* at the Chi2-added regions showing decreased branching.

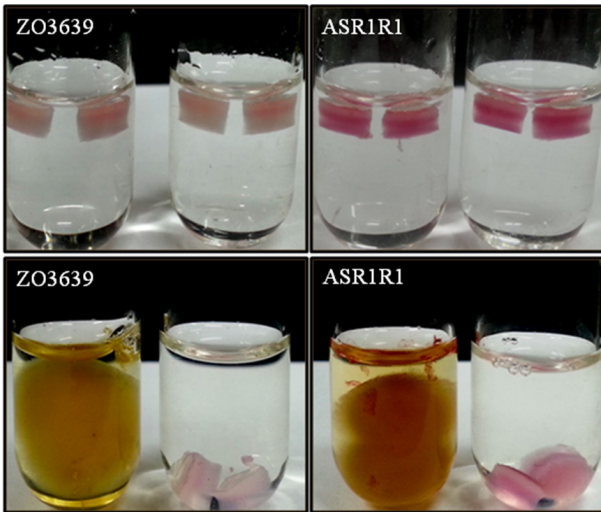


Fig. 5. Confirmation of growth inhibition of two strains of *F. graminearum* in PDB. Top, after inoculation; Bottom, on day 6.

이지 않았다(Fig. 5).

전 세계적으로 기후변화가 점차 크게 나타나면서 식량 생산량이 인류의 건강과 복지에 중요한 부분을 차지하게 되었다. 농작물에 질병을 일으키는 병원성 균류의 생장을 억제하는 농약의 종류는 이루 말할 수 없이 많으나 이들은 대부분 유기합성을 통하여 만든 것으로서 인체에게 2차적인 위험을 일으킨다(Paro *et al.*, 2012). 그러나 단백질인 chitinase는 자연계에서 쉽게 분해되기 때문에 먹이그물을 통한 2차적인 문제를 일으킬 염려가 없다. *Aspergillus niger*로부터 정제된 chitinase를 직접 사용하여 균류의 생장을 억제한 논문에서 *Fusarium culmorum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani* 등에는 생장억제 효과를 보였으나 이 실험에서 사용한 *A. alternata*와 또 다른 병원균류 *Fusarium oxysporum*에는 효과를 보이지 않았다(Brzezinska and Jankiewicz, 2012). 이러한 결과에 근거하여 이 논문에서 보고한 효소가 충분한 활용 가능성이 있다고 판단된다.

### 적요

먹물버섯 *C. congregatus*의 자가분해되는 자실체 조직에서 발현되는 chitinase (Chi2)가 식물병원성 균류인 *A. alternata*와 *F. graminearum*를 대상으로 고체배지와 액체배지에서 포자의 발아 및 균사 생장에 대하여 보이는 억제효과 실험을 수행하였다. 액체배지에서 50 µg/ml의 Chi2 농도에서 *A. alternata*의 포자 발아가 90% 이상 억제되었고, 70 µg/ml의 농도에서 실험균류 모두 생장이 억제되었다. 고체배지에서 하루에 6 µg씩 2회 더한 Chi2에 의하여 *F. graminearum* 균사 생장이 억제됨을 확인하였고, 이때 균사의 branching이 상대적으로 감소하였다.

### 감사의 말

이 실험에 사용된 *F. graminearum* 균주들은 순천향대학교 윤성환 교수로부터 분양 받았으며 이에 감사합니다. 이 논문은 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 산학협력 선도대학 육성사업의 연구결과임.

### 참고문헌

- Amian, A.A., Papenbrock, J., Jacobsen, H.J., and Hassan F. 2011. Enhancing transgenic pea (*Pisum sativum L.*) resistance against fungal diseases through stacking of two antifungal genes (chitinase and glucanase). *GM Crops* 2, 104–109.
- Brzezinska, M.S. and Jankiewicz, U. 2012. Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control. *Curr. Microbiol.* 65, 666–672.
- Choi, H.T. and Cho, C.W. 2005. Ultrastructural studies on the autolysis of *Coprinellus congregatus*. *Korean J. Microbiol.* 41, 312–315.
- Chung, S. and Kim, S.D. 2007. *Escherichia coli* can produce recombinant chitinase in the soil to control the pathogenesis by *Fusarium oxysporum* without colonization. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 474–480.
- Distefano, G., Malfa, S.L., Vitale, A., Lorito, M., Deng, Z., and Gentile, A. 2008. Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. *Transgenic Res.* 17, 873–879.
- Gottwald, D., Samans, B., Lück, S., and Friedt, W. 2012. Jasmonate and ethylene dependent defence gene expression and suppression of fungal virulence factors: Two essential mechanisms of *Fusarium* head blight resistance in wheat? *BMC Genomics* 13, 369–411. (doi:10.1186/1471-2164-13-369).
- Jonkers, W., Dong, Y., Broz, K., and Listler, H.C. 2012. The Wor1-like protein Fgp1 regulates pathogenicity, toxin synthesis and reproduction in the phytopathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathog.* 8, 1–18.
- Kang, Y., Kim, H., and Choi, H.T. 2012. Biochemical characterization of chitinase 2 expressed during the autolytic phase of the inky cap, *Coprinellus congregatus*. *J. Microbiol.* Article in press.
- Lim, H. and Choi, H.T. 2009. Enhanced expression of chitinase during the autolysis of mushroom in *Coprinellus congregates*. *J. Microbiol.* 47, 225–228.
- Lim, H. and Choi, H.T. 2010. Growth inhibition of the yeast transformant by the expression of a chitinase from *Coprinellus congregates*. *J. Microbiol.* 48, 706–708.
- López-Matas, M.A., Aslava, A.P., and Diaz-Minguez, J.M. 2000. Mcchs1, a member of a chitin synthase gene family in *Mucor circinelloides*, is differentially expressed during dimorphism. *Curr. Microbiol.* 40, 169–175.
- Paro, R., Tiboni, G.M., Buccione, R., Rossi, G., Cellini, V., Canipari, R., and Cecconi, S. 2012. The fungicide mancozeb induces toxic effects on mammalian granulose cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 260, 155–161.
- Zhao, J., Li, S., Jiang, T., Liu, Z., Zhang, W., Jian, G., and Qi, F. 2012. Chilling stress—the key predisposing factor for causing *Alternaria alternata* infection and leading to cotton (*Gossypium hirsutum L.*) leaf senescence. *PLoS ONE* 7, 1–11.