

# 살균제 내성 고추탄저병원균의 유전적 변이 탐색 및 방제를 위한 천연 멜라닌 합성 억제제(항 침투 살균제)의 개발

최창원 · 황순섭 · 이민용 · 최봉금

(배재대학교 자연과학대학 생명과학부 생물약학과)

## Screening of Fungicide Resistant Isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* and Design of Melanin Biosynthesis Inhibitor from Natural Sources (Antipenetrant fungicides)

Choi, Chang-Won · Hwang, Soon-Seop · Lee, Min-Yong · Choi, Bong-Kum

Dept. of Biology and Medicinal Science, Division of Life Sciences, College of Natural Science,  
Pai Chai University, Taejon 302-735, Korea

### 적 요

탄저병 균주의 배양학적 및 형태학적 특성을 분석한 결과 다양성이 있었지만 일반적으로 규칙적인 가장자리, 색소는 오렌지, 갈색, 흑회색 등 다양, 균사체의 높이가 높고 풍부하게 밀집, 방사상 콜로니, 전형적인 포자를 가졌다. 수집된 44 균주의 병원성은 접종 후 고추표면에 약한 혹은 심한 대형 흑갈색 반점, 무병징 등 다양하였으며, 대다수가 G strain으로 동정되었다. 고추 탄저병원균 36 균주의 각 살균제에 대한 저항성 분포는 약간 치우친 대형형이었고 각 균주의 살균제에 대한 반응은 처리된 살균제 및 농도에 따라 감수성(sensitive), 중도저항성(moderately resistant), 저항성(highly resistant)의 3 단계로 구별되었다. Mancozeb 감수성 균주는 시험된 균주 중 약 16%, 중도저항성 균주는 약 81.3%, 저항성 균주는 약 2.7%로 측정되었고, Chlorothalonil에 대한 반응은 감수성 균주는 약 8%, 중도저항성 균주는 약 62%, 저항성 균주는 약 30%로 측정되었다. Fenarimol에 대한 반응에서 감수성 균주는 약 5.4%, 중도 저항성 균주는 약 86.6%, 저항성 균주는 약 8%로 측정되었다. Rep-PCR은 4개의 반복 primer를 이용하여 *Colletotrichum* spp. 44 균주를 대상으로 실시하여 뚜렷한 band의 유무에 의해 공통군(common group; CG)과 변이군을 분리할 수 있었다. 공통군은 병원성 및 rep-PCR 분석 결과를 종합해 볼 때 전형적인 G strain으로 동정되었다. (CAG)<sub>5</sub>는 30개의 균주를 공통군(CG<sub>1</sub>)으로, (TGTC)<sub>4</sub>는 34개의 균주를 공통군(CG<sub>2</sub>)으로, (GACAC)<sub>3</sub>는 29개의 균주를 공통군(CG<sub>3</sub>)으로, (GACA)<sub>4</sub>는 32개의 균주를 공통군(CG<sub>4</sub>)으로, 나머지는 각 변이군으로 분류하였다. 분석 결과 24개의 균주는 4개의 primer에 의해 항상 공통군으로 분류된 반면 8개 균주는 공통군에서 항상 제외되었다. 나머지 7개의 균주 4개의 primer 중 적어도 3개에 의해 공통군으로 분류되었고, 공통군과 84~96% 동질성을 보여 복제 변이로 고려된다. 3균주는 4개의 primer 중 적어도 2개에 의해서 공통군으로 분류되었고 동질성은 다양하였다. 2균주는 단지 (TGTC)<sub>4</sub>에 의해 공통군으로 분류되었으나 공통군과는 68~70% 범주에서 동질성을 보였고, 서로간에는 95% 동질성을 나타내었다. 멜라닌 색소 결핍 돌연변이체를 유도하기 위해 tryptone 혹은 peptone이 첨가된 지방분해능 배지를 조제하여 PC31 균주를 접종하여 배양한 결과 tryptone 및 tween 200이나 -80을 첨가한 지방분해능 배지에서 효과적으로 균사체가 변형되고 멜라닌 색소가 결핍된 돌연변이체가 성장되었고 멜라닌 결핍이 균주의 병원성과 어떤 관계가

있는가를 관찰하기 위해 돌연변이 균주의 포자 현탁액 및 agar plug를 푸른 고추에 접종한 결과 상처를 주지 않은 고추에서는 거의 감염이 일어나지 않았고 상처를 준 경우에도 wild type과 비교하여 탄저병 반점의 크기를 크게 감소하였다. 멜라닌 합성을 억제하는 물질을 탐색하기 위해 다양한 국내 자생식물로부터 물질을 유기용매에 의해 추출하고 항산화 및 항진균 활성을 결정하였다. 항산화 물질은 국내 자생식물의 추출물을 TLC chromatography와 DPPH 염색법 및 지질과산화 억제 활성을 이용하여 측정된 결과 삼백초와 상백피의 추출물이 우수한 것으로 판명되었고, 또한 항진균 효과에 있어서도 삼백초 및 상백피의 추출물은 다른 추출물이나 기존 살균제 보다도 균사의 방사상 성장, 색소 및 포자 형성 억제 활성이 우수한 것으로 평가되어 항침투 살균제로서의 가능성이 타진되었다. 또한 추출 시료 중 등글레 및 황기 등에서 추출한 물질을 mushroom tyrosinase와 혼합 처리하여 전기영동을 실시한 결과 tyrosinase 활성 밴드가 강력히 억제되었다. 따라서 등글레 및 상항버섯에서 추출한 성분에 tyrosinase활성을 억제할 수 있는 억제제가 존재한다는 것이 판명되었다. 또한 26과 43종의 식물로부터 추출한 시료의 melanin 합성 저해 능력을 시험하기 위해 항 tyrosinase 활성을 spectrophotometer를 이용하여 측정된 결과에 있어서 등글레, 달래, 황기 등의 추출물이 우수한 저해능을 가진 것으로 관찰되었다.

## I. 서론

작물병원성 진균류에서 유전적 변이가 쉽게 일어나고, 약제내성 변이체가 급속도로 전파되는 점을 감안할 때, 병원성 진균류 변이체의 약제내성을 정밀 분석하는 일은 병원성 진균류를 방제하는 데 매우 중요한 자료가 된다. 이러한 자료를 토대로 완벽한 환경친화형 생물농약의 formulation이 완성될 수 있기 때문이다. 매년 국내 고추생산에 질과 양적인 측면에서 심각한 경제피해를 입히는 고추탄저병은 전국적으로 해마다 확산되고 있지만, 효율적인 방제 시스템 개발을 위한 수 많은 연구에도 불구하고 확실한 방법을 제시하고 있지 못하다. 실제로 포장에서 탄저병을 방제하는데 사용된 다양한 농약이 효과적으로 병을 제어하는데 실패하고 있는 실정인데, 근본적인 이유는 탄저병원 균주들이 기주 품종에 따라 또는 지역적, 생태적으로 적응하여 변이를 잘 일으킬 뿐 아니라 살균제에 대한 내성도 쉽게 증가시키기 때문이다. 또한 살균제의 활성작용부위(target site) 및 기작이 고려되지 않은 상태에서 농가에서 무분별하게 살포되는 것도 하나의 이유로 생각할 수 있다. 약제내성은 자연 생태계에서 급격한 진화의 과정을 보여주는 병원성 균주의 집단 유전에 대한 중요한 요인 중 하나로 인식되고 있기 때문에 같은 종 내에서 약제저항성 및 감수성 균의 유전적 프로파일을 비교하는 것이 절대적으로 필요하다. 무성생식 진균의 경우 같은 종

내의 유전재조합(intraspecific genetic recombination)은 heterokaryosis나 의사유성 교환과정(parasexual cycle)에 의해 잠재적으로 매개된다고 알려져 있으나, 실제로 포장에서는 기대치 않게 다양한 핵형(karyotype)을 보여주는 많은 진균들이 살균제에 대해 내성(tolerance)을 갖거나 저항성 기주에 대해 신속하게 적응하고 있는 것으로 나타나고 있다.

살균제는 크게 표면의 감염부위에 직접 작용하는 국소성 제제(nonsystemic agent)와 많은 조직과 기관에 흡수 이행되어 작용하는 전신성 제제(systemic agent)로 구별해 볼 수 있다. 전신성 살균제 계열을 보면, phenol-ether화합물인 griseofulvin, polyene 계열인 amphotericin B, hamycin, nystatin, natamycin, pyrimidine 계열인 flucytosine, azole 유도체인 miconazole, ketoconazole, fluconazole, genaconazole, itraconazole, saperconazole, peptide 계열인 cilofungin, saramycetin, allylamine 계열인 terbinafin, naftifine, morpholines 계열인 fenpropimorph 등이 있다. 이들 살균제의 항진균 작용기작은 스테롤 합성억제, 세포벽 합성효소 억제, 핵산합성 억제, tubulin 저해, 전자전달계 저해, 신호전달체제변환, 단백질합성 저해 등으로 나타난다. 그러나 작용부위에 따른 다양한 항진균제의 개발에도 불구하고 진균병은 점점 더 증가 추세에 있다.

최근 식물병원성 진균류의 침입 기작에 관한 증거들이 제시되고 있는데 그 중 멜라닌(melanin)이 관심의 대상이 되고 있다. 고분자로서 암갈색이나 흑색

색소를 띤 진균 유래 멜라닌의 합성은 polyketide 대사회로의 중간체인 1, 3, 6, 8-tetrahydroxy-naphthalene의 합성에서 시작되는데, 이것은 탈수와 환원 과정을 통해서 1, 8-dihydroxynaphthalene(DHN)으로 전환된다(Bell and Wheeler, 1986). 멜라닌 합성회로의 유전자 집단이 기주특이적 AK 독소를 분비하여 일본 배 흑반병을 일으키는 *Alternaria alternata*에서 처음 발견된 이래 30kb 구간 내에 적어도 멜라닌 합성회로의 3가지 유전자가(ALM, BRM1, BRM2) 포함된 것으로 밝혀졌다(Kimura and Tsuge, 1993). *A. alternata*의 경우 멜라닌은 병원성보다는 자연계에서의 포자의 생존과 수명에 보다 중요한 역할을 하는 것으로 사료되었다. 실제로 1, 3, 8-THN reductase에 코딩한 *BRM2* 유전자를 불활성화 시킨 결과 병원성, 균사 성장, 포자의 수 등이 감소되지 못하였으나, 포자의 크기 및 격막의 수는 감소했다. 따라서 포자의 발달과 멜라닌의 합성과의 밀접한 관련이 있는 것으로 추론되었고 *BRM2* 돌연변이 균주는 UV에 보다 민감하다고 보고되었다(Kawamura *et al.*, 1999). 반면에 후자의 경우 *Magnaporthe* 및 *Colletotrichum* spp.에서 멜라닌이 병원성의 요인으로 제시되었는데, 특히 *C. lagenarium*과 *C. lindemuthianum*(Kubo and Furusawa, 1991) 및 도열병 원균주인 *Magnaporthe grisea*의 기계적 침투를 위해서 필요한 부착기의 팽압은 멜라닌의 축적과 밀접하게 관련된 것으로 보고되었다(Howard and Ferrari, 1989). 멜라닌 합성은 pentaketide의 합성으로부터 시작되고 scytalone을 형성한다. *PKS1* 유전자에 코딩된 polyketide synthase는 초기과정에 포함되는데, 일련의 탈수(dehydration)와 환원(reduction) 과정이 뒤따른다. 1, 3, 6, 8-tetrahydroxynaphthalene이 tetrahydroxynaphthalene reductase에 의해(NADPH dependent reduction) scytalone으로 전환되고, 이것이 scytalone dehydratase(SCD1 유전자에 코딩)에 의해 탈수화되어 1, 3, 8-trihydroxynaphthalene(THN)로 된다. THN은 1,3,8-THN reductase(*THR1* 유전자에 코딩)에 의해 vermeline으로 되고, scytalone dehydratase에 의해 1,8-dihydroxynaphthalene(DHN)으로 전환되는 polyketide 회로를 통해, 결국에는 DHN이 전구체로서 산화되고 중합되어 멜라닌을 형성한다(Bell and

Wheeler, 1986). 포자에 *N'*-nitro-N-nitrosoguanidine을 처리하여 만든 *C. lagenarium* 멜라닌 결핍 돌연변이 균주를 연구를 통해 3 유전자(*PKS1*, *SCD1*, *THR1*)가 멜라닌 합성에 절대적으로 요구된다고 보고되었고, 불활성화시킨 유전자들(gene disruption)을 가진 형질 변환된(fungal transformation) 균주들은 효과적으로 식물의 침투 및 감염을 일으키지 못했다(Kubo *et al.*, 1991; Takano *et al.*, 1995; Kubo *et al.*, 1996; Perpetua *et al.*, 1996).

보리깜부기병을 일으키는 *Ustilago hordei* 및 *Agaricus bisporus*와 white truffle 등의 버섯이 속한 담자균은 catechol로부터 유래되는 멜라닌을 합성하는데, 중합 과정에 tyrosinase와 laccase 등이 관여한다(Piattelli *et al.*, 1965; Miranda *et al.* 1992; Ragnelli *et al.* 1992; Miranda *et al.* 1996). 진핵 및 원핵생물에서 광범위하게 탐색되는 tyrosinase(EC 1.14.18.1)는 monophenol의 hydroxylation과 o-diphenol이 o-quinols로 산화되는 과정을 촉매하는 효소로서 멜라닌과 polyphenol 계 물질의 형성에 관여한다. 포유류에서는 TRP-1 및 TRP-2와 같은 단백질이 알려져 있고, 식물에서는 polyphenol oxidase(PPO) (EC 1.10.3.1)가 알려져 있다. 3,4-dihydroxy-phenylalanine(DOPA)은 효소학적 갈변화에 특이적 기질로 발견되었고, 한번 합성되면 DOPA는 일련의 자발적 산화과정을 수행하고 순환하여 고분자의 멜라닌을 합성한다. 따라서 tyrosinase에 의한 갈변화 혹은 멜라닌 축적은 다양한 억제제에 의해 지연되거나 중지될 수 있다는 증거들이 제시되어 왔다. Melasma, 주근깨(freckles), 기미(lentigines) 등과 같은 비정상적인 색소체 과다는 여러 종류의 탈색소제(hydroquinone, ascorbic acid 유도체, kojic acid, arbutin, azelaic acid, corticosteroids, retinoids)를 처리했을 때 뚜렷한 효과가 있음이 판명되었다. 이러한 억제제 중 hydroquinone은 80% 까지 효과를 보여주었으나 피부염이나 가려움증을 유발하여 steroids와 같이 사용해야 한다. 특히 arbutin은 배나무나 초본식물에 풍부히 존재하는데 일본에서는 melasma나 UV에 손상된 피부에 치료제로 이용한다. 따라서 본 연구에서는 다양한 식물로부터 강력한 활성을 가진 멜라닌 합성 억제제를 추출해 이를 항

담자균제 및 피부노화를 지연시키거나 멜라닌 색소의 축적을 방지할 수 있는 미백 화장품이나 세정제의 첨가제로 활용하고자 한다.

플라보노이드(flavonoids)는 polyphenolic 화합물로서 식물의 모든 조직에 다양한 종류로 분포되어있고 항진균(antifungal), 항암(anticarcinogenic), 항바이러스(antiviral), 항알레르기(anti-allergic), 항염증(anti-inflammatory) 활성을 지닌 것으로 알려져 있다. 특히 플라보노이드는 비타민 C 나 E, selenium 보다도 강력한 항산화 활성(antioxidants)을 가진 것으로 이를 증거하는 보고들이 제시되고 있고 일부 플라보노이드는 체내의 항산화 효소인 superoxide dismutase(SOD)와 glutathione peroxidase(GOD)의 활성을 조절할 수 있다.

본 연구의 공시균주인 *Colletotrichum*은 진균의 분화 및 식물과의 상호작용을 연구하는데 있어 장점을 가지고 있는데, 그 중 첫 번째는 식물에 영양관계를 확립하는데 있어 기생영양(biotrophic) 및 괴저영양(necrotrophic)의 두 가지 양식을 모두 보여주고, 두 번째로는 발아관(germ tubes), 부착기(appressorium), 세포내 균사(intracellular hyphae), 2차적 괴저영양체 균사(secondary necrotrophic hyphae) 등 일련의 특별한 감염구조가 잘 발달되어 병원성의 분자생물학 및 세포학적 연구를 하는데 가장 적절한 모델이 될 수 있기 때문이다. 이러한 *Colletotrichum*의 전통적인 분류법은 포자의 모양과 크기, 부착기의 모양, 균총의 형태, 색소(pigmentation) 및 성장상의 특성 등으로 구분하고 있으나 균주의 변이를 탐색하는데는 한계가 있었다. 최근 분자 유전학적인 marker를 이용하여 *Colletotrichum*의 유전적 다양성을 종 및 strain 수준까지 구분하는 방법이 널리 활용되고 있는데 예를들면 rDNA의 보전적인 서열을 primer로 이용하는 PCR법이나 임의 염기를 primer로 이용하는 RAPD, 진핵생물이나 원핵생물의 지놈(genome)에 광범위하게 존재하는 반복적인 염기를 이용한 rep-PCR 혹은 RFLP 등에 의해 변이를 쉽게 탐색할 수 있게 되었다.

본 연구에서는 본 연구자의 실험실에서 수집하여 보관 중인 탄저병 균주중 일부를 대상으로 약제내성 균주를 선별하고 반복염기를 primer로 이용하여 다음

과 같이 rep-PCR을 실시하여 유전적 상관도를 분석하고자 한다. 따라서 본 연구는 포장에서 분리된 고추탄저병(*Colletotrichum gloeosporioides*) 균주의 유전적 변이체 들을 선별하여 이들을 대상으로 환경친화형 생물학적 방제법을 구축 개발하고자 한다. 따라서 약제내성 변이 균주의 유전적 특성을 분석하고 진균의 멜라닌 합성 대사회로의 중요 효소를 목표로 이를 억제하는 천연성분의 항침투(Antipenetrant) 국소성 살균제를 개발하고자 하는 것이 목표이다. 따라서 특별한 배지조성에 의해 albino 돌연변이체를 탐색하여 멜라닌이 결핍된 균주의 병원성을 검정하고, 또한 식물유래 멜라닌 합성 억제제를 분리하여 특성을 규명한다. 탄저병 제어능력은 배지에 멜라닌 합성 억제제를 처리하여 포자의 발아, 포자의 수, 포자의 크기, 부착기의 형성, 균사 성장 등 배양학 및 형태학적 특성을 분석하고 고추에 *Colletotrichum* 접종한 전후 직접 살포하여 병의 진전을 관찰하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 살균제 내성 균주의 선별 및 유전적 다양성

#### 가. 공시균주

최근 3년간 대전을 포함한 충남북 일대, 경북의 일부 고추 재배 지역에서 전형적인 탄저병징을 나타내는 청 및 홍고추를 수집하여 단포자 분리하여 27°C에서 7일간 PDA 배지에서 배양하여 공시 균주로 이용하였다(Table 1). 균주 *C. gloeosporioides* KG13은 금호생명환경과학 연구소의 오병준 박사로부터 공급되었으며, 대조균주 *C. gloeosporioides* 40003, 40005, 40006, 40042는 KACC로부터 분양받았고, 수박에서 분리한 *C. orbiculare* 2 균주를 형태학적 특성에 의해 동정하고 본 연구에 포함하였다. 균사의 성장, 콜로니 형태, 색소 등이 관찰되었으며 포자의 형태 및 크기는 400X 배율에서 광학현미경으로 관찰하였다 (Fig. 1). 각 균주의 액체배양은 PDB 배지에 성장 중인 균사의 가장자리를 접종한 후 27°C 온도에서 shaking incubator에서 배양하였다. 청고추 및 홍고추에 대한 각 균주의 접종은 포자현탁액(2x10<sup>5</sup>)이나 일정 크기

Table 1. List of isolates of *Colletotrichum* spp. used in this study

Isolate #	Geographical origin	Host fruit	Colony margin	Diameter growth <sup>1</sup>	Reference
KG13	Taejon	Green pepper	Regular	7.2X7.5	Oh et al.
40003	R strain	Pepper	Regular	7.7X7.8	KACC2
40005	G strain	Pepper	Regular	6.6X6.7	KACC
40006	R strain	Pepper	Regular	6.0X6.2	KACC
40042	G strain	Pepper	Regular	6.6X6.7	KACC
PC01	Youngju, Kyungbuk	Red pepper	Regular	6.8X6.7	Authors
PC02	Chongyang, Chungnam	Red pepper	Irregular	6.7X7.0	Authors
PC03	Taejon	Red pepper	Irregular	6.9X7.1	Authors
PC04	Kumsan, Chungnam	Red pepper	Regular	6.6X5.6	Authors
PC05	Taejon	Red pepper	Irregular	7.2X7.0	Authors
PC06	Hongsong, Chungnam	Red pepper	Regular	6.7X7.5	Authors
PC07	Yesan, Chungnam	Red pepper	Irregular	5.6X5.7	Authors
PC08	Kongju, Chungnam	Red pepper	Regular	6.5X6.4	Authors
PC09	Youngju, Kyungbuk	Red pepper	Regular	6.6X6.6	Authors
PC10	Kumsan, Chungnam	Red pepper	Regular	8.5X8.5	Authors
PC11	Yesan, Chungnam	Red pepper	Irregular	6.9X6.6	Authors
PC12	Chongyang, Chungnam	Red pepper	Irregular	6.9X6.9	Authors
PC13	Kongju, Chungnam	Green pepper	Regular	7.0X7.7	Authors
PC14	Chongwon, Chungbuk	Red pepper	Regular	6.7X6.7	Authors
PC15	Kongju, Chungnam	Red pepper	Irregular	6.7X7.0	Authors
PC16	Kongju, Chungnam	Red pepper	Regular	6.6X6.4	Authors
PC17	Boryung, Chungnam	Red pepper	Regular	6.5X7.1	Authors
PC18	Hongsong, Chungnam	Green pepper	Irregular	6.6X6.6	Authors
PC19	Taejon	Red pepper	Regular	6.7X6.9	Authors
PC20	Kumsan, Chungnam	Red pepper	Regular	6.5X7.0	Authors
PC21	Kongju, Chungnam	Red pepper	Regular	7.2X7.4	Authors
PC22	Chongyang, Chungnam	Red pepper	Regular	7.0X7.0	Authors
PC23	Kongju, Chungnam	Red pepper	Regular	6.8X7.2	Authors
PC24	Kongju, Chungnam	Red pepper	Regular	6.6X6.7	Authors
PC25	Chongyang, Chungnam	Red pepper	Regular	6.7X6.7	Authors
PC26	Chongyang, Chungnam	Red pepper	Irregular	6.7X6.8	Authors
PC27	Chongyang, Chungnam	Green pepper	Regular	6.8X6.6	Authors
PC28	Chongyang, Chungnam	Red pepper	Regular	8.1X8.2	Authors
PC29	Chongyang, Chungnam	Red pepper	Irregular	7.2X6.7	Authors
PC30	Yesan, Chungnam	Red pepper	Irregular	6.5X6.6	Authors
PC31	Taejon	Green pepper	Regular	6.5X6.5	Authors
PC32	Taejon	Watermelon	Regular	7.6X7.8	Authors
PC33	Taejon	Watermelon	Regular	6.8X8.5	Authors
PC34	Chongyang, Chungnam	Green pepper	Regular	6.5X6.4	Authors
PC35	Chongyang, Chungnam	Red pepper	Regular	6.5X6.0	Authors
PC36	Chongwon, Chungbuk	Red pepper	Regular	6.8X7.1	Authors
PC37	Chongyang, Chungnam	Green pepper	Irregular	6.7X6.8	Authors
PC39	Chongyang, Chungnam	Red pepper	Regular	7.3X7.0	Authors
PC40	Chongyang, Chungnam	Red pepper	Regular	7.2X7.2	Authors

<sup>1</sup>Diameter growth is expressed as measured colony diameter (cm) at 7 days after inoculation minus inoculum plug diameter.

<sup>2</sup>Korean Agricultural Culture Collection

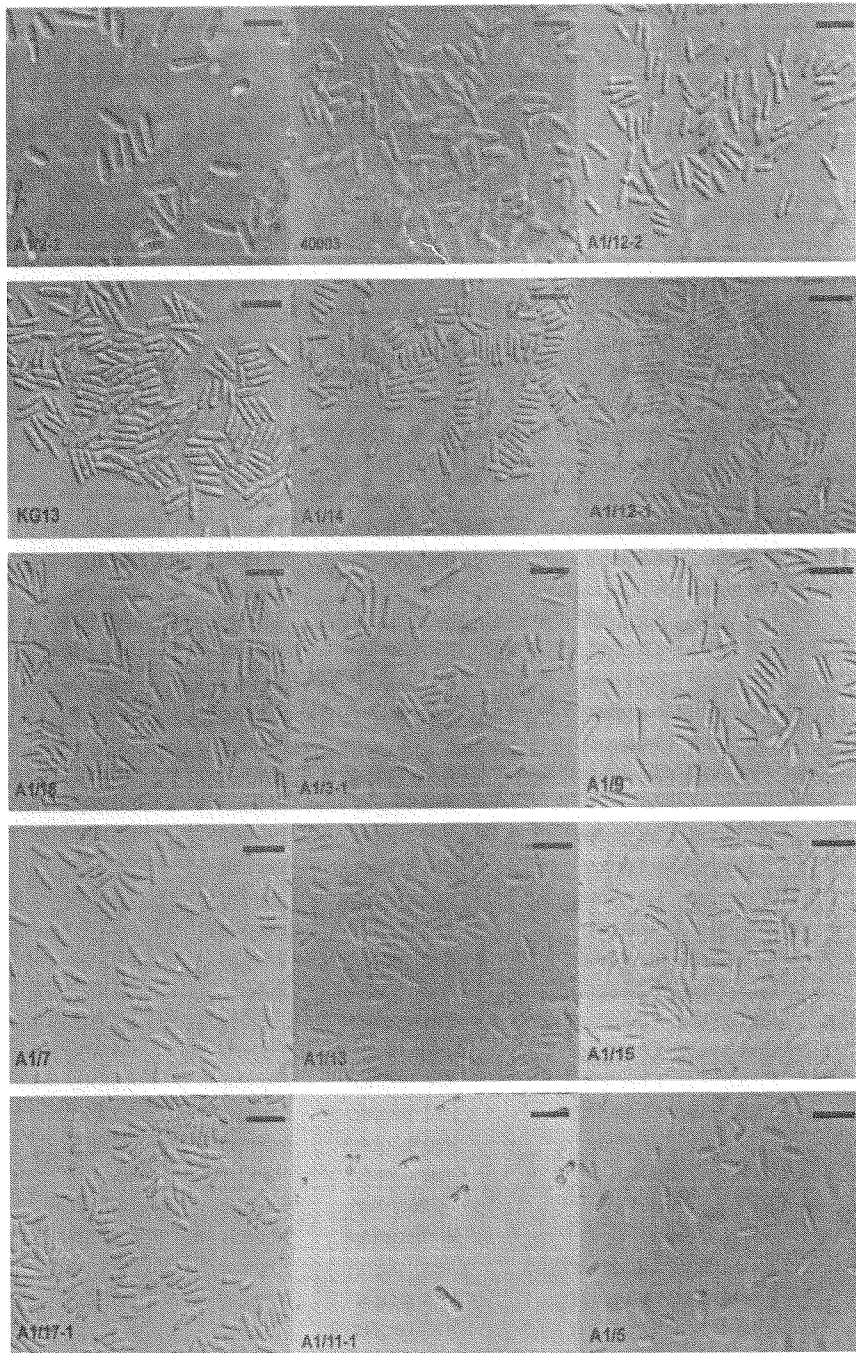


Fig. 1. Conidia shapes of *Colletotrichum* isolates isolated from peppers (x 400) Scale bars = 22.5 $\mu$ m.  
From upper left to bottom right PC10 (A1/2-2), 40003, PC34, KG13, PC11(A1/14), PC02 (A1/12-1), PC03 (A1/18), PC15 (A1/3-1), PC40 (A1/9), PC29 (A1/7), PC12 (A1/13), PC30 (A1/15), PC31 (A1/17-1), PC35 (A1/11-1), and PC05 (A1/5).

의 agar plug을 표면에 처리하였다. 병징은 각 고추 표면에 상처를 준 것과 주지 않은 것에 나타난 반점의 유무에 따라 +/-로 결정하였고, 적어도 균주당 6~10회 반복하였다 (Fig. 2).

#### 나. 병원성 검정

푸른 고추와 붉은 고추에 포자 현탁액을 접종하여 G와 R strain을 구별하고 반점의 크기를 측정하여 병원성을 결정하였다.

#### 다. 살균제 내성균주의 선발

탄저병원균주의 살균제 내성을 검정하기 위해 chlorothalonil(75% WP), fenarimol(12.5% EC), mancozeb(75% WP)의 3 종류 살균제를 사용하였고, 이들 살균제에 대한 내성을 결정하기 위하여 배지에서 배양 중인 각 균주의 가장자리 부위를 punching (5mm agar plug)하여 각 살균제가 농도별로 처리된

PDA배지에 접종하였다(chlorothalonil 과 mancozeb: 0, 1, 100, 1000, 2000 $\mu$ g ai./ml, fenarimol의 경우 0, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2 $\mu$ g ai./ml). PDA배지에 이들 살균제를 처리하기 위해 각 살균제를 10 ml 멸균 증류수에 녹여 filtering한 후 멸균된 배지에 적정 농도로 첨가하였고, 접종 후 27°C에서 7일간 배양한 후 콜로니의 크기를 측정하였다(Fig. 3). 군사성장과 살균제의 농도간 관계는 회귀분석(regression analysis)에 의해 결정하였고 각 균주에 대한 EC<sub>50</sub>는 regression equation에 의해 계산하였고 각 실험은 3 반복 수행하였다. 각 살균제를 위와 같은 농도로 처리한 1.5% water agar 배지에 접종한 포자의 발아는 형광빛에서 2일간 25°C 온도에 배양한 후 3반복의 평균값으로 측정하였다.

#### 라. rep-PCR

탄저병원균을 효과적으로 분류하는데 사용되는 반복염기 (CAG)<sub>5</sub>, (TGTC)<sub>4</sub>, (GACAC)<sub>3</sub>, (GACA)<sub>4</sub>를

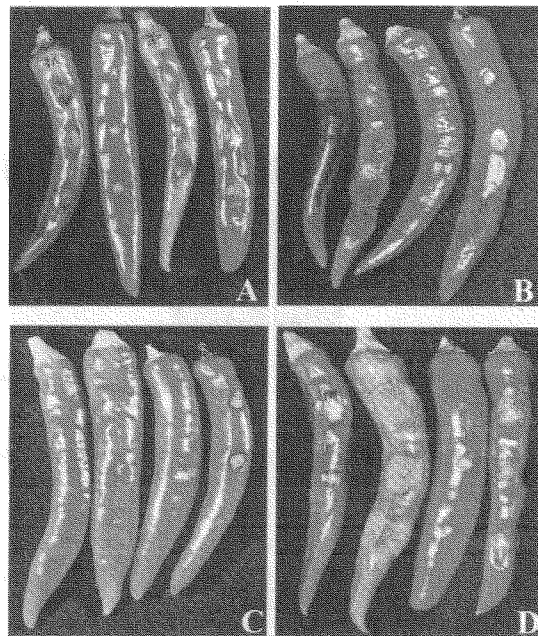


Fig. 2. Various lesion size depending on the *Colletotrichum gloeosporioides* isolates inoculated on the wounded or unwounded surface of green and red fruits. (A) isolate KG13 (spore suspension  $1 \times 10^6$ ) on (from left to right) unwounded green, red fruits and wounded green, red fruits. (B) isolate PC20, (C) PC10, and (D) PC40, each isolate (spore suspension  $1 \times 10^6$ ) was inoculated on unwounded and wounded green fruits; unwounded and wounded red fruits (from left to right).

primer로 이용하여 PCR을 실시하였다. 결과분석은 증폭된 DNA band의 유무를 pairwise 비교를 통해 NTSYS(version 1.80)의 SIMQUAL을 통해 분석하였다. 액체배양한 균사체를 저속원심분리하여 DNA를 Freeman의 방법에 따라(1993) 정제하고 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 녹인 후 10~100 ng/ $\mu$ l 농도로 희석하였다. rep-PCR 분석을 위해 사용된 4개의 primer (CAG)<sub>5</sub>, (TGTC)<sub>4</sub>, (GACAC)<sub>3</sub>, (GACA)<sub>4</sub>는 식물에 존재하는 반복염기에서 유래되었다 (Freeman *et al.*, 1996). 게다가 남조류 지놈에서 유래한 2종류의 STRR 반복 염기 STRR1A (3' -CCCCTRACCCCTRACC-5')와 STRR1B (5' -GGGGAYTGGGGAYTGG-3')를 (Rasmussen and Svenning, 1998) 적용하였다. PCR은 50ng 지놈 DNA; 10mM Tris-HCl; 50mM KCl; 각각의 0.25mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1U Taq DNA polymerase(Takara, Japan); 1-3 $\mu$ M primer가 포함된 20 $\mu$ l 혼합액을 Gene thermocycler(Bio-RAD, USA)에서 반응시켰다. PCR 반응은 30반복 cycle로 다음과 같이 수행하였다. 95°C에서 30초 denaturation 후, (CAG)<sub>5</sub>의 경우 60°C에서,

(GACA)<sub>4</sub>의 경우 40°C에서, (GACAC)<sub>3</sub>의 경우 48°C에서, (TGTC)<sub>4</sub>의 경우 45°C에서 각각 30초 동안 annealing을 하고 72°C에서 1분 30초간 extension을 실시하였다. STRR primer의 경우 95°C에서 6분간 1회 처리 후 (denaturation: 94°C 1분, annealing: 46°C 1분, extension 65°C 5분) 30 반복 cycle을 실시한 후, 증폭된 PCR 산물을 1% agarose gel에서 분석하였다. 결과 분석은 증폭된 DNA band의 유무를 pairwise 비교를 통해 NTSYS(version 1.80)의 SIMQUAL을 통해 분석하였다.

## 2. 멜라닌 합성억제제의 추출 및 활성분석

### 가. 배지조성에 의한 albino 돌연변이체 탐색

Tryptone이나 Peptone, Tween 20 혹은 -80, CaCl<sub>2</sub>, agar를 첨가한 지방분해능 배지에 탄PC31을 접종하여 DHN 멜라닌 결여 돌연변이체를 탐색하였다.

### 나. DHN 멜라닌 합성 억제제 탐색

#### 1) 식물재료 및 추출법

썩갓, 치커리, 인진썩, 굴 껍질, 도라지, 삼백초, 어

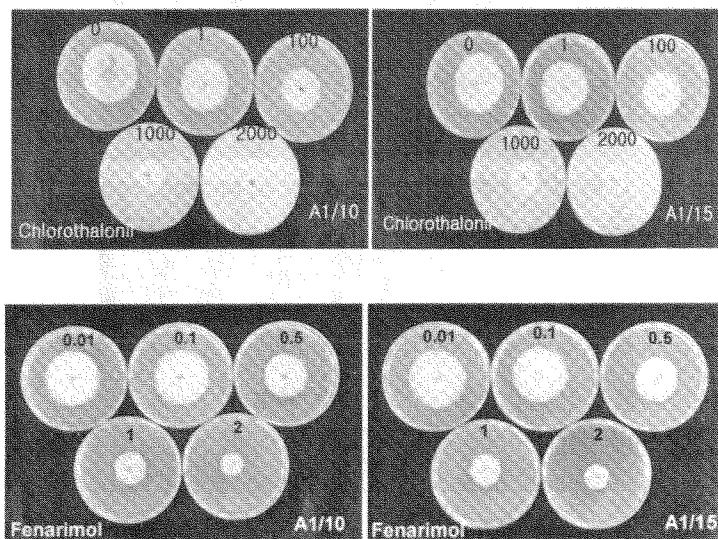


Fig. 3. Sensitivity of *Colletotrichum* isolates PC07 (A1/10) and PC30 (A1/15) to fungicides. Each isolate was inoculated onto PDA, treated with various dilutions of fungicides (chlorothalonil: 0, 1, 100, 1000, 2000 $\mu$ g a.i./ml, fenarimol 0, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2 $\mu$ g a.i./ml).



성초, 등글레, 만병초, 홍화씨, 마, 삼지구엽초 등의 동결건조 시료를 액체질소에 마쇄한 후 50% ethanol에 첨가하여 85°C에서 약 1시간씩 2회 가열하여 추출하였다. 추출액을 합하여 Speed Vac을 이용하여 증발 농축하여 분말상태로 만든 후 정량하여 다음 실험에 사용하였다.

## 2) TLC chromatography

추출물의 비교 검출은 상업적으로 시판중인 다양한 플라보노이드를 대조구로 활용하여 Precoated silica gel G F254 plate를 이용하여 chloroform-ethyl acetate(60:40, vol/vol), ethyl acetate-formic acid-acetic acid-water(100:11:11:26, vol/vol), ethyl acetate-methanol-water(100:13.5:10), toluene-ethyl acetate(93:7), hexane-ethyl acetate-glacial acetic acid(63:35:0.5), toluene-chloroform-ethanol(40:40:10), chloroform-glacial acetic acid-methanol-water(60:32:12:8) 등의 다양한 전개 용매를 이용하여 전개하여 TLC상의 spot을 UV light(254 및 365 nm) 조사 및 다양한 spraying agent를 분사하여 실시하고 spot 부위를 긁어내어 fraction 별로 활성을 조사하였다.

## 3) Free radicals 제거 능력 및 항산화 활성

① dot-blot & staining 방법: 새로운 방법으로 많은 시료에서 항산화 물질을 신속하게 탐색 가능하다. 각 시료를 농도별로 희석시킨 후 TLC 판(silica gel 60 F254, Merck)에 분주한 후 DPPH 용액에 처리하여 보라색 배경에 노랑 반점의 강도를 관찰하였다.

② DPPH free radical scavenging activity: 추출액을 농도별로 처리한 반응액과 DPPH ethanol 용액을 혼합하여 37°C에서 30분간 처리한 후 515nm 에서 흡광도의 변화를 측정하였다. % 억제도는 무처리한 대조구와 비교하여 결정하고 IC50은 50% DPPH free radical을 제거할 수 있는 추출액의 농도에서 결정하였다.

③ 지질과산화 측정: 항산화활성은 지질과산화 억제활성을 측정하여 결정하고 이때 불포화지방산을 다량 함유한 linoleic acid를 지질원으로 하여 Fe<sup>3+</sup>/ascorbate에 의한 지질과산화 결과 생성된 malondialdehyde(MDA)를 2-thiobarbituric acid(TBA)

와 반응시켜 530nm에서 spectrophotometer로 흡광치를 측정하여 시료에 의하여 감소된 MDA의 양을 정량하여 환산하였다.

## 4) 항진균활성

① 포자형성 억제: *C. gloeosporioides* PC31를 다양한 추출액 농도별로 처리한 배지에 접종한 후 7일 후 포자현탁액을 만들어 hemacytometer로 포자의 수를 측정하였다.

② Radial growth inhibition: 식물 추출물 및 플라보노이드를 첨가한 PDA배지에 PC31을 접종하고 7일 후 방사상 성장의 크기를 측정하였다. 5반복이 동시에 실시되었고 산출된 값은 평균치± 표준오차로 표시하였다. 성장억제 %는 평균치만으로 다음 공식에 의해 계산하였다.

## % Inhibition =

$$\frac{\text{mycelial growth in control} - \text{mycelial growth in extracted plant}}{\text{mycelial growth in control}} \times 100$$

mycelial growth in control

## 5) 멜라닌 합성의 억제

멜라닌 억제제의 활성도 측정: 순수분리된 억제물질을 첨가한 액체배지에서 희석법, 평판 확산법, 농도에 따른 균주의 배양 성장곡선의 변화 등으로 측정하고 고체배지에서 포자의 수, 크기, 발아여부에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하였다.

## 6) 항침투 활성 검증

천연 생물소재에서 추출한 멜라닌 억제제가 기존의 멜라닌 합성 살균제와 비교하여 항침투 활성 및 항진균활성이 어떠한가를 결정하기 위해 tryptone이 첨가된 지방분해능배지에서 자란 albino mutant의 포자현탁액 및 agar plug을 푸른 고추에 5반복 접종하였고, 삼백초 추출물을 첨가한 배지에서 자란 균사체 plug를 포자현탁액 wild type 병원성 균주의 포자현탁액 및 agar plug를 푸른 고추에 접종하기 전 후에 억제제를 직접 살포하고 병의 발생 및 반점의 감소크기를 측정하였다. 이때 대조구로서 화학 살균제 tricyclazole을 같은 방법으로 처리한 것과 wild type 병원성 균주의 포자현탁액 및 agar plug를 처리한 고

추를 포함하여 비교하였다.

#### 다. Tyrosinase 촉매 생성 melanin 억제

##### 1) 식물재료 및 추출

동글레 및 황기 뿌리, 뽕나무 껍질, 삼백초 및 어성초 잎, 달래 뿌리 등 36과 43종의 다양한 동결건조 시료를 액체질소에 마쇄한 후 ethanol, methanol, dichloromethane, ethyl acetate, 물 등을 첨가하여 60°C에서 약 1시간씩 2회 가열하여 추출. 각각의 추출액을 Speed Vac이나 동결건조법을 이용하여 증발 농축하여 분말 상태로 만든 후 실험에 사용하였다.

2) Tyrosinase 억제활성 측정 1: 0.5ml의 0.1M phosphate(pH 6.8) buffer에 용해된 추출된 powder를 25°C에 10분간 처리한 후, 0.5ml의 mushroom tyrosinase 및 murine tyrosinase를 각각 0.5ml의 0.03% DOPA를 혼합하여 5분간 30°C에서 반응. 반응액에서 생성된 dopachrome(melanin의 전구체)의 양을 흡광치 475nm에서 측정하여 3종류의 대조구와 비교하여 억제활성을 측정.

3) 전기영동을 이용하여 tyrosinase의 억제활성 측정: 추출액을 mushroom tyrosinase와 혼합하여 처리한 후 native gel electrophoresis를 실시하고 dopa 용액에 activity staining을 실시하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 살균제 내성 균주의 선발 및 유전적 다양성

가. 고추 탄저병원균의 배양적, 형태학적 특성 및 병원성

대다수의 균주는 규칙적인 가장자리를 가졌으며 색소는 오렌지, 갈색, 흑회색 등 다양하였다. 유일하게 PC28은 보라색 색소를 나타내어 *Colletotrichum* sp.로 분류하였다. 많은 균주들은 균사체의 높이가 높고 풍부하게 밀집되었으며, 일부 균주들은 불규칙적인 가장자리, 균사체의 높이가 낮고 드문드문하게 느슨한 균사체를 가졌다(Table 2). 방사상 콜로니의 크기는 5.6~8.5cm의 범주에 있으며 전형적인 포자의 모양은 난형의 단핵 세포로서 크기는 4~22.5×4~6µm로

다양하였다. 대다수의 균주는 규칙적인 가장자리를 가졌으며 색소는 오렌지, 갈색, 흑회색 등 다양하였다. 유일하게 PC28은 보라색 색소를 나타내어 *Colletotrichum* sp.로 분류하였다. 많은 균주들은 균사체의 높이가 높고 풍부하게 밀집되었으며, 일부 균주들은 불규칙적인 가장자리, 균사체의 높이가 낮고 드문드문하게 느슨한 균사체를 가졌다(Table 2). 방사상 콜로니의 크기는 5.6~8.5cm의 범주에 있으며 전형적인 포자의 모양은 난형의 단핵 세포로서 크기는 4~22.5×4~6µm로 다양하였다(Fig. 1).

44균주의 병원성은 접종 후 고추표면에 약한 혹은 심한 대형 흑갈색 반점, 무병징 등 다양하였다(Fig.2). G strain으로 동정된 대다수의 균주들은 청고추, 홍고추 모두 심하게 감염하였으며 감염 후 7일 내에 전형적인 탄저병징인 침상 괴저반점을 보였다. 3균주 PC20, PC39, PC40은 상처를 주지 않은 청고추에 약한 반점을 나타내었으나 상처주지 않은 홍고추에는 무병징이었다. 그러나 상처를 준 경우 청고추에 심한 병징을 나타내었고 홍고추조차 가볍게 부패된 반점이 관찰되었다. 균주 KG13은 고추표면에 상처를 주지 않은 경우 위의 3균주와 유사하게 청고추에만 병징이 있었으나, 상처를 준 경우에는 청고추, 홍고추 모두 심한 병징이 관찰되었다. 대조 R strain 균주 40003 및 40006과 마찬가지로 홍고추에 만 병징을 나타내는 PC10은 R strain으로 판명되었고 상처를 준 경우 병징이 더 강하게 나타났다. 때때로 상처를 준 경우 청고추에서 반점의 흔적이 관찰되기도 했다. 예외적으로 PC28은 상처의 유무에 관계없이 홍고추에만 약한 반점을 나타내었고, 수박탄저병원균인 *C. orbiculare* PC32와 PC33을 접종한 고추표면은 무병징으로 관찰되었다.

#### 나. 고추탄저병원균의 유전적 변이

Rep-PCR은 4개의 반복 primer를 이용하여 *Colletotrichum* spp. 44균주를 대상으로 실시하여 뚜렷한 band의 유무에 의해 공통군(common group; CG)과 변이군을 분리할 수 있었다. 공통군은 병원성 및 rep-PCR 분석 결과를 종합해 볼 때 전형적인 G strain으로 동정되었다. 각 primer에 의한 뚜렷한 다형

Table 2. Cultural and morphological characteristics of *Colletotrichum* isolates on PDA

Isolate #	Symptom		Colony color		Hyphae abundance	Mycelial form	Elevation
	red	green	reverse	surface			
KG13	-	+	Brown	Grey	Sparse	Compact	Moderate
40003	+	-	Orange grey	Orange grey	Sparse	Loose	Moderate
40005	+	+	Black grey	Black grey	Sparse	Loose	Low
40006	+	-	Black grey	Black grey	Sparse	Loose	Low
40042	+	+	Brown	Light grey	Abundant	Compact	Moderate
PC01	+	+	Brown	Light grey	Abundant	Compact	Moderate
PC02	+	+	Light brown	Light grey	Sparse	Compact	Moderate
PC03	+	+	Light brown	Light grey	Abundant	Loose	Moderate
PC04	+	+	Light grey	Grey	Abundant	Compact	High
PC05	+	+	Grey black	Grey	Abundant	Compact	High
PC06	+	+	Orange brown	Grey orange	Sparse	Compact	Moderate
PC07	+	+	Brown	Light grey	Abundant	Loose	Moderate
PC08	+	+	Orange brown	Dark grey	Abundant	Compact	High
PC09	+	+	Grey	Grey	Abundant	Compact	Low
PC10	+	-	Orange grey	Light grey	Abundant	Compact	High
PC11	+	+	Orange brown	Grey	Sparse	Compact	Low
PC12	+	+	Brown	Light grey	Sparse	Loose	Low
PC13	+	+	Light grey	White grey	Abundant	Compact	High
PC14	+	+	Light grey	Light grey	Abundant	Compact	Moderate
PC15	+	+	Black	Dark grey	Abundant	Compact	Moderate
PC16	+	+	Grey black	Grey	Abundant	Compact	Moderate
PC17	+	+	Dark brown	Grey brown	Sparse	Loose	Low
PC18	+	+	Light brown	Light grey	Abundant	Compact	Moderate
PC19	+/-	+	Light brown	Light grey	Abundant	Loose	Moderate
PC20	+	+	Orange	Orange	Sparse	Loose	High
PC21	+	+	Brown	Grey	Abundant	Compact	High
PC22	+	+	Light brown	Light grey	Sparse	Loose	Low
PC23	+	+	Orange brown	Grey	Abundant	Compact	Moderate
PC24	+	+	Dark brown	Light grey	Abundant	Compact	Low
PC25	+	+	Dark brown	White grey	Abundant	Compact	High
PC26	+	+	Grey black	Grey black	Sparse	Loose	Moderate
PC27	+	+	Light brown	Grey	Sparse	Compact	High
PC28	+	-	Purple	Purple	Abundant	Compact	Moderate
PC29	+	+	Light brown	Grey brown	Abundant	Compact	Moderate
PC30	+	+	Light brown	Light grey	Sparse	Compact	Low
PC31	+	+	Dark brown	Dark grey	Abundant	Compact	Moderate
PC32	-	-	Grey black	Light grey	Abundant	Compact	High
PC33	-	-	Grey black	White grey	Abundant	Compact	High
PC34	+	+	Light brown	Grey	Sparse	Compact	Moderate
PC35	+	+	Dark brown	Grey	Abundant	Compact	Moderate
PC36	+	+	Light brown	Light brown	Abundant	Compact	Low
PC37	+	+	Brown Dark	grey	Abundant	Compact	Low
PC39	+	+	Light grey	Light grey	Abundant	Compact	Low
PC40	+	+	Orange brown	Grey	Abundant	Compact	High

Table 3. Strain determination of *Colletotrichum* isolates by symptom and rep-PCR analysis

Isolate #	Variation by primers						Identification	Strain
	<sup>1</sup> RS1	RS2	RS3	RS4	STRRIA	STRRIB		
KG13	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	+	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
40003	+	+	+	+	+	+	<i>C. gloeosporioides</i>	R
40005	+	+	+/-		+	+	<i>C. gloeosporioides</i>	G
40006	+	+	+	+	+	+	<i>C. gloeosporioides</i>	R
40042	CG <sub>1</sub>	+	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	+	+	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC01	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC02	+	CG <sub>2</sub>	+	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC03	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC04	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC05	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	+	+	+	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC06	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC07	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC08	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC09	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC10	+	+	+	+	+	+	<i>C. gloeosporioides</i>	R
PC11	+	+	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC12	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC13	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC14	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC15	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	+	+	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC16	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	+	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC17	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC18	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC19	+	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	+	+	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC20	+	+	+	+	+	+	<i>Colletotrichum</i> sp.	-
PC21	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC22	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC23	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC24	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC25	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC26	+ CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	+	+	+		<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC27	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC28	+	+	+	+	+	+	<i>Colletotrichum</i> sp.	-
PC29	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	+	+	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC30	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	+	+	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC31	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC32	+	+	+	+	+	+	<i>C. orbiculare</i>	-
PC33	+	+	+	+	+	+	<i>C. orbiculare</i>	-
PC34	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	CG <sub>3</sub>	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC35	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	+	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC36	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	+	CG <sub>4</sub>	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC37	CG <sub>1</sub>	CG <sub>2</sub>	+	CG <sub>4</sub>	+	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC39	+	CG <sub>2</sub>	+	+	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G
PC40	+	CG <sub>2</sub>	+	+	CG <sub>5</sub>	CG <sub>6</sub>	<i>C. gloeosporioides</i>	G

<sup>1</sup>RS1=(CAG)<sub>5</sub>, RS2=(TGTC)<sub>4</sub>, RS3=(GACAC)<sub>3</sub>, RS4=(GACA)<sub>4</sub>

성은 공통점과 차이점으로 다음과 같이 구별되었다 (Table 3). (CAG)<sub>5</sub>는 30개의 균주를 공통군(CG<sub>1</sub>)으로 PC02, PC10, PC11, PC19, PC20, PC26, PC28, PC32, PC33, PC39, PC40 및 reference isolates인 40003, 40005, 40006을 변이군으로 분류하였고, (TGTC)<sub>4</sub>는 34개의 균주를 공통군(CG<sub>2</sub>)으로 PC10, PC11, PC20, PC28, PC32, PC33 및 40003, 40005, 40006, 40042를 변이군으로 분류하였고, (GACAC)<sub>3</sub>는 29개의 균주를 공통군(CG<sub>3</sub>)으로 PC02, PC05, PC10, PC14, PC20, PC28, PC32, PC33, PC35, PC37, PC39, PC40 및 KG13, 40003, 40005, 40006을 변이군으로 분류하였고, (GACA)<sub>4</sub>는 32개의 균주를 공통군(CG<sub>4</sub>)으로 PC05, PC10, PC20, PC26, PC28, PC32, PC33, PC39, PC40 및 40003, 40005, 40006을 변이군으로 분류하였다. 분석 결과 24개의 균주는 4개의 primer에 의해 항상 공통군으로 분류된 반면 8개 균주는 PC10, PC20, PC28, PC32, PC33, 40003, 40005, 40006은 공통군에서 거의 제외되었다. 나머지 7개의 균주 KG13, 400042, PC05, PC19, PC35, PC36, PC37은 4개의 primer 중 적어도 3개에 의해 공통군으로 분류되었고, 공통군과 84~96% 동질성을 보여(Table 4) 복제 변이로 고려된다. 3균주 PC02, PC11, PC26은 4개의 primer 중 적어도 2개에 의해서 공통군으로 분류되었고 동질성은 다양하였다 (PC02: 90%, PC11: 64%, PC26: 55%). 2균주 PC39와 PC40은 단지 (TGTC)<sub>4</sub>에 의해 공통군으로 분류되었으나 공통군과는 68~70% 범주에서 동질성을 보였고, 서로간에는 95% 동질성을 나타내었다. 균주 PC10은 공통군과 44%, reference isolates 40003(R strain)과는 75%, 40006(R strain)과는 38% 동질성을 나타냈고, 병원성 검정 결과 R strain으로 동정되었다. 균주 PC20는 공통군과 41%의 동질성을 보이는데, G와 R strain과는 유전적으로 판이한 변이주로 판단된다. 또 다른 균주 PC28은 *C. gloeosporioides*의 모든 균주와의 동질성이 16~33%의 범주로, 보라색의 색소를 띠는 배양상의 특성과 홍고추에만 나타나는 약한 병원성 등을 종합하여 분석한 결과 유전적으로 상이한 다른 종으로 판단된다. 2개의 대조균주인 수박탄저병원균 *C. orbiculare*는 서로간에 65% 동질성을 나타내었는데, 고추탄저병원균인 *C. gloeosporioides*와의 중

간동질성(interspecies similarity)은 8~34%의 범주로 계산되었다. *C. gloeosporioides* 균주들을 위에 언급한 4개의 primer에 의한 분리와 STRR primer에 의한 분리 grouping과는 매우 근사한 일치감을 보여주었으나 다소 차이점도 발견되었다. STRR1A primer는 27개 균주를 공통군(CG<sub>5</sub>)으로 나머지 균주들 (PC05, PC10, PC15, PC16, PC19, PC20, PC26, PC28, PC29, PC30, PC32, PC33, PC37, 40003, 40005, 40006, 40042) 변이군으로 분류하였다. STRR1B primer는 29개 균주를 공통군(CG<sub>6</sub>)으로 나머지 균주들 (PC05, PC10, PC15, PC19, PC20, PC26, PC28, PC29, PC30, PC32, PC33, 40003, 40005, 40006, 40042) 변이군으로 분류하였다.

#### 다. 살균제 내성 균주의 선발

고추 탄저병원균 36균주의 각 살균제에 대한 저항성 분포는 약간 치우친 대칭형이었고(skewness: mancozeb=0.39, chlorothalonil=0.03, fenarimol=3.74), 균주의 EC<sub>50</sub> 값은 mancozeb: 46.6~1105.4 μg a.i./ml, chlorothalonil: 528.2~2985.7 μg a.i./ml, fenarimol: 0.8~8.4 μg a.i./ml 범주로 측정되었다. 균주 PC20은 mancozeb 1000 μg/ml 수준에서 내성이 가장 높았고 PC25는 가장 민감 하였다. 균주 PC27은 chlorothalonil 1000 μg/ml 수준에서 내성이 가장 높았고 PC28은 가장 민감 하였다. 균주 PC07은 fenarimol 2 μg/ml 수준에서 내성이 가장 높았고 PC28은 가장 민감하였다 (Table 5). 각 균주의 살균제에 대한 반응은 처리된 살균제 및 농도에 따라 감수성(sensitive), 중도저항성(moderately resistant), 저항성(highly resistant)의 3단계로 구별되었다(Fig. 3). Mancozeb 500 μg/ml 보다 EC<sub>50</sub>값이 작은 감수성 균주는 시험된 균주 중 약 16%, 500~1000 μg/ml 범주의 EC<sub>50</sub>를 가진 중도저항성 균주는 약 81.3%, 1000 μg/ml 이상의 EC<sub>50</sub> 값을 가진 저항성 균주는 약 2.7%로 계산되었다. Chlorothalonil에 대한 반응은 1000 μg/ml 보다 EC<sub>50</sub> 값이 작은 감수성 균주는 약 8%, 1000~1500 μg/ml 범주의 EC<sub>50</sub>를 가진 중도저항성 균주는 약 62%, 1500 μg/ml 이상의 EC<sub>50</sub> 값을 가진 저항성 균주는 약 30%로 계산되었다. Fenarimol에 대한 반응에서 1 μg/ml 보다

EC<sub>50</sub>값이 작은 감수성 균주는 약 5.4%, 1~2 $\mu$ g/ml 범주의 EC<sub>50</sub> 값을 가진 중도 저항성 균주는 약 86.6%, 2 $\mu$ g/ml 이상의 EC<sub>50</sub>값을 가진 저항성 균주는 약 8%로 계산되었다. PC06 균주는 mancozeb에 감수성, chlorothalonil에 중도저항성, fenarimol에 저항성을 나타내었다.

포자발아율은 각 살균제의 저농도 처리에서 분명하게 감소하였다(Table 5). 대다수의 균주들은 공통적으로 균사성장 및 포자발아율에 있어 mancozeb에 감수성을 반면에 fenarimol에 대해서는 저항성을 보였다. Chlorothalonil은 균사성장을 효과적으로 억제하지 못하였으나 포자발아는 저농도에서조차 명백하게

억제하였다. 본 실험에서 처리된 살균제에 대한 각 균주의 EC<sub>50</sub> 값은 고추탄저병 방제를 위해 실제 포장에서 살포되는 상업적 농도보다 낮았다. 그러나 균사성장에 대한 chlorothalonil에 대한 EC<sub>50</sub> 값은 균주들 2/3 이상이 살포농도보다 높았다. Chlorothalonil은 포자발아에 효과적인 억제작용을 가졌음에도 불구하고 균사성장은 억제하지 못하였다. 반면에 fenarimol은 균사성장과 포자발아를 억제하였다.

각 균주들의 EC<sub>50</sub>값 평균치는 mancozeb: 573.2 $\mu$ g a.i./ml, chlorothalonil: 1728.9 $\mu$ g a.i./ml, fenarimol: 1.9 $\mu$ g a.i./ml 이었다. Mancozeb과 fenarimol의 경우 각 균주의 EC<sub>50</sub>값은 각각이 포장에서 권장되는 농도인 1500

Table 4. Matrix of similarity (%) of Colletotrichum isolates based on rep-PCR.

#	Similarity (%) to isolate																KG 13	400 03	400 06	400 05	400 42						
	CG	PC02	PC05	PC10	PC11	PC19	PC20	PC26	PC28	PC32	PC33	PC35	PC36	PC37	PC39	PC40											
CG	-																										
PC02	90	-																									
PC05	66	56	-																								
PC10	44	38	30	-																							
PC11	73	71	35	44	-																						
PC19	91	92	56	46	88	-																					
PC20	41	37	36	43	33	36	-																				
PC26	55	59	91	18	47	52	29	-																			
PC28	21	24	26	26	30	21	24	21	-																		
PC32	28	23	26	13	29	19	34	22	25	-																	
PC33	19	14	29	15	19	11	31	20	17	65	-																
PC35	96	86	64	33	60	78	40	55	23	30	19	-															
PC36	96	86	64	33	60	78	40	55	23	30	19	100	-														
PC37	84	74	67	28	55	73	38	60	16	24	19	88	88	-													
PC39	68	64	52	9	45	57	30	46	18	32	21	71	71	59	-												
PC40	70	64	54	9	48	61	30	46	21	29	18	74	74	61	95	-											
KG 13	88	81	56	18	66	79	32	51	18	20	8	92	92	79	77	82	-										
400 03	35	34	11	75		24	24	16	28	33	33							-									
400 06	24		33	15		32	26	32	37	21	21							24	-								
400 05	32		35	38		38	28	33	32	24	24							24	42	-							
400 42	50		67	28		82	43	62	22	36	36							24	33	38	-						

\* Percentage similarity is the average calculated from pairwise comparisons done by using SIMQUAL of NTSYS among representative isolates of Colletotrichum spp. CG (isolates of common group showing uniform bands) and variant isolates by any 4 primers, (CAG)5, (TGTG)4, (GACAC)3, (GACA)4.

Table 5. Sensitivity of isolates of *Colletotrichum* spp. to fungicides by <sup>1</sup>EC<sub>50</sub> and <sup>2</sup>spore germination

Isolate #	EC <sub>50</sub>			spore germination		
	Mancozeb	Fenarimol	Chlorothalonil	Mancozeb	Fenarimol	Chlorothalonil
	1000 µg/ml	2 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml	2 µg/ml	1000 µg/ml
KG13	<sup>3</sup> -	-	-	0	7±2.9	1±1.0
PC01	721.9	1.7	1208	0	6±1.4	10±0.9
PC02	784.5	1.5	1685.2	1.3±0.6	3±1.5	0
PC03	758	1.6	2741.3	0	2±0.8	0.3±0.3
PC04	697.1	1.8	2111.8	0	24±12.5	1±0.4
PC05	714.2	1.3	1190.7	0	8±8.0	0
PC06	334.5	3.1	1691.3	0.3±0.3	25±0.7	1±0.6
PC07	919.1	4.6	2190	14±2.9	2±0.4	0
PC08	887.8	1.5	1457	0	2±0.6	1±0.6
PC09	361.7	1.2	743.4	0	40±10	1±0.6
PC10	600.8	1.5	697.3	0	19±3.2	0
PC11	690.9	1.7	1941.8	0	35±13.7	0
PC12	743.2	1.5	1640.4	3±1.8	23±13.7	0
PC13	696	1.4	1507.6	0	1±0.9	1±0.4
PC14	593.8	1.6	1573.4	0 12±0.9 0		
PC15	-	-	-	- 0	7±3.2	0
PC16	596.5	1.6	1024	0	6±1.2	1±0.6
PC17	575.7	1.5	1700.60	0	40±9.1	0
PC18	865.9	1.7	2777.3	0	50±5.0	0
PC19	817.6	1.9	2051.3	0	2±0.9	1±0.4
PC20	1105.4	1.3	1384.2	0	50±0	0
PC21	704.1	1.6	1544.8	0	48±1.0	0
PC22	807	1.5	1917	0	5±1.8	0.7±0.3
PC23	628.3	1.2	1900.7	0	11±5.9	0
PC24	728.2	1.3	1222.5	0	49±1.0	1±0.4
PC25	265.6	1.8	1796	0	47±1.5	2±0.6
PC26	303.4	1.8	-	0	47±1.5	0.3±0.3
PC27	960.2	1.9	2985.7	0	21±3.9	0
PC28	689	0.8	528.2	0	45±5.3	0.3±0.3
PC29	684.3	1.5	2135	0	4010	0
PC30	832.6	1.6	1800	0	8±2.2	0.7±0.6
PC31	807.6	1.8	2167.3	0	10±1.2	0.7±0.3
PC32	449.9	2.5	2353.7	0	2±0.4	1±0.4
PC33	351.4	1.0	1707.5	0	6±1.2	0
PC34	711.8	1.6	2033	0	42±6.0	0
PC35	710.3	1.5	1607.6	0	0.7±0.6	0
PC36	649.9	1.5	1656.4	0	35±4.7	0
PC37	681.9	1.5	2013	0	7±1.8	0
PC39	-	-	-	0	47±1.7	0
PC40	-	-	-	0	2±1.7	0

<sup>1</sup>Effective concentration for 50% inhibition of mycelial growth.

<sup>2</sup>Data are the mean±standard error of three replications per isolate.

<sup>3</sup>No determination.

$\mu\text{g a.i./ml}$  및  $41.7\mu\text{g a.i./ml}$  보다 낮았다. 그러나 chlorothalonil의 경우는 포장에서 권장되는 농도인  $1237.5\mu\text{g a.i./ml}$  보다 높았다.

## 2. 멜라닌 합성억제제의 추출 및 활성분석

가. 지방분해능 배지를 이용한 DHN 멜라닌 결여 돌연변이체 탐색

1) 배지조성: 영양조건이나 pH, 온도, 건조와 같은 환경조건은 pigment 생성 유무 및 정도와 같이 진균의 세포대사과정 및 생존과 수명에 심각한 영향을 미친다(Bell and Wheeler, 1986; Lichter et al., 1998). 멜라닌 색소 결핍 돌연변이체를 유도하기 위해 tryptone 혹은 peptone이 첨가된 지방분해능 배지를 조제하여 PC31 균주를 접종하여 배양한 결과 tryptone을 첨가한 지방분해능 배지에서 효과적으로 균사체가 변형되고 멜라닌 색소가 결핍된 돌연변이체가 성장되었다. 그러나 tryptone 혹은 peptone 만을 첨가한 PDA배지에서는 wild type과 마찬가지로 암회색의 색소가 생성되었다. 또한 지질원으로 tween 20, tween 80, olive oil, linoleic acid, tributyrin을 각각 첨가하였는데 tween 20 및 80만이 효과적으로 멜라닌 색소가 결핍되었고 균사체 colony 주변에는 균이 세포 밖으로 분비한 지방분해효소(lipase)에 의해 lysis zone이 평균  $1.53\text{mm}$  정도 형성되었다. 균사체의 성장 속도는 PDA 배지에서 성장중인 wild type보다도 오히려 신속하게 확대되었지만(Table 6), 접종원 주위로 비정상적 형태의 물질이 축적되었고 밀도에 있어서 흰 균사체는 성글게 형성되어 균사체가 자라는 가장자리에만 존재했다(Fig. 4). 일반적으로 진균은 다당류를 분해하여 단당류를 성장의 탄소원으로 이용하는데 지방분해능 배지에서 자란 균주는 지방분해효소를 과다 분비하여 세포의 정상적인 생리과정에 영향을 주어 아마도 색소 생성에 불리한 albino가 만들어지고 지방 분해에 의한 분해물질이 축적된 것으로 사료된다.

2) 멜라닌 결핍 돌연변이체의 침투 활성 분석: 멜라닌 결핍이 균주의 병원성과 어떤 관계가 있는가를 관찰하기 위해 지방분해능 배지에서 자란 균주의 포자

현탁액 및 agar plug를 푸른 고추에 접종한 결과 상처를 주지 않은 고추에서는 거의 감염이 일어나지 않았고 상처를 준 경우에도 wild type과 비교하여 탄저병 반점의 크기를 크게 감소하였다(Fig. 5). Tricyclazole을 처리한 배지에서 자란 균주의 포자현탁액을 접종한 고추는 오히려 wild type의 것보다도 더 큰 병반 크기를 보여주었다(Table 7). 이러한 결과는 지방분해효소가 기주 식물의 큐티클(cuticle)을 분해하여 침입하는데 중요한 역할을 한다는 이전의 보고와는 오히려 상반된 결과를 보여준다. 과거의 보고를 살펴보면 진균이 표피를 통해서 식물을 직접 침입하는데 큐티클의 효소적인 분해가 있어야 하기 때문에 큐티클을 확실하게 분해하는 cutinase가 결정적인 요소로 인식되었으나(Kolattukudy 1984; Trail and Koller, 1990), Botrytis cinerea의 cutinase 결핍 돌연변이체가 wild-type과 마찬가지로 기주 큐티클을 통해 침입하고 병증을 일으키는 실험 증거가 제시됨으로서 cutinase가 기주 침투에 필수적인 요인은 아니라고 보고되었다(Van Kan et al. 1997). 최근 lipase의 활성을 억제하는 antilipase 항체가 Botrytis cinerea가 토마토 잎을 감염하는 것을 억제하였고(Comménil et al., 1998), 큐티클의 구성요소인 waxes, 천연 cutin, cutin hydrolysates를 첨가한 배지에서 lipase가 생성되는 것이 관찰되었다(Comménil et al., 1999). 따라서 lipase가 기주 큐티클을 침입하는데 관여할 뿐 아니라 표면 인식이나 부착에도 관여할 것으로 추정하고 있다.

## 나. DHN 멜라닌 합성 억제제 탐색

1) 국내자생식물 유래 DHN 멜라닌 억제제 탐색

### ① 항산화 활성

세계적으로 다양한 식물들의 추출물이 항균활성을 가졌다는 수많은 보고들이 있었다. 그 중 실제로 생물농약으로 개발된 것은 극소수이다. 항산화 물질을 신속하게 탐색하기 위하여 국내 자생식물의 추출물 및 상업용 플라보노이드를 TLC chromatography를(Fig. 6 A) 한 후 DPPH 염색을 한 결과 색의 강도는 시료에 존재하는 항산화 물질의 양 및 radical 제거능의 본질에 따라 다양하였다(Fig. 6 B). 각 추출시료에서 강한 free radical 제거능을 보인 노랑 밴드는 삼백초에서



1개, 도라지에서 3개, 홍화씨에서 1개, 등글레에서 1개, 상백피에서 3개가 관찰되었다. TLC chromatography의 전개용매 7가지 시스템 중에서 toluene/ ethyl acetate(93: 7) 및 n-butanol/ glacial acetic acid/ water(50: 10: 20) 시스템이 분리에 효과적이었다. 각 시료에서 추출한 물질의 항산화 활성을 지질과산화 활성 억제법에 의해 측정하여 본 결과 DPPH 염색에 의한 결과와 다소 다른 측정 결과를 보여주었다. 도라지에서 3개의 항산화 밴드가 관찰되었음에도 불구하고 지질과산화 억제활성은 음성으로 측정되었고 반면에 어성초는 지질과산화 억제활성이 17%로 측정되었

으나 DPPH 염색 결과 밴드가 전혀 관찰되지 않았다. 그러나 삼백초 추출물은 예상한대로 지질과산화 억제 활성이 31%로서 상업적으로 정제된 flavonoids와 비교했을 때 catechin, morin, rutin 보다는 낮았지만, quercetin과 naringenin 보다는 높았다. 따라서 항산화 물질을 순수정제하여 활성을 측정하면 상당히 높은 활성이 기대된다(Table 8). 약용재료로 널리 활용되는 삼백초와 어성초는 삼백초과에 속하는 식물로서 예로부터 해독초로 널리 활용되었다.

② 항진균 활성

멜라닌 합성을 억제하는 살균제로 널리 알려진 것

Table 6. Effect of flavonoids and fungicides on mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides* PC31.

Treatment	IsolateDays after inoculation				
	2	4	6	8	
No treatment	4.3±0.3	12.7±0.3	21.7±0.3	29.3±0.3	
tricyclazole	5±0.0	11.7±0.3	18±0.6	24±0.6	
isoprothiolane	5.3±0.3	12.3±0.3	20±0.0	27±0.0	
ftalide	4±0.0	10±0.0	17±0.0	22.3±0.3	
tryptone*	6±0.316	15.6±0.245	23.4±0.245	31.8±0.2	
peptone*	7±0	13.8±0.2	22.2±0.49	31±0.49	
morin	20 µg/ml	4±0.577	12.3±0.334	19.7±0.334	28.3±0.88
	40 µg/ml	4±0	12.3±0.334	19.7±0.334	28.3±0.88
	80 µg/ml	4.3±0.334	11.7±0.334	19.7±0.334	25±0.557
	160 µg/ml	4.7±0.334	11.7±0.334	19.3±0.577	24.7±1.453
rutin	20 µg/ml	4.7±0.334	12.7±0.334	20.3±0.667	27.7±1.334
	40 µg/ml	5±0.577	13±0.577	21.3±0.882	28±0.557
	80 µg/ml	5±0	12.7±0.334	21.3±0.334	28.3±0.334
	160 µg/ml	4.7±0.334	12.3±0.334	21±0.577	27.3±0.334
quercetin	20 µg/ml	4.3±0.334	12.3±0.334	20.3±0.334	28±0
	40 µg/ml	4.7±0.334	12.7±0.334	21±0	27.7±0.334
	80µg/ml	4.7±0.334	12±0	20.3±0.334	26.7±0.334
	160µg/ml	4±0 12±0	19.7±0.334 25.7±0.224		
naringenin	20µg/ml	4.7±0.334	12.3±0.334	20.3±0.334	28.7±0.667
	40µg/ml	4.3±0.334	12±0	20.3±0.334	27.3±0.334
	80µg/ml	4.7±0.334	11.7±0.334	19.3±0.334	26±0
	160µg/ml	3.7±0.334	10.3±0.334	18±0.577	22±0.577

All treatment except tryptone and peptone were performed on PDA.

\*Tryptone and peptone, respectively, were added into lipolytic medium.

Values are mean±S.E. of 3 replications.

은 tricyclazole, pyroquilon, fthalide, carpropamid 등이 있는데, 활성작용부위에 다소 차이가 있다. 군사생장, 포자발아, 부착기 형성에 대해 미약한 억제효과를 보이지만 2차 감염에 탁월한 억제 효과를 보인 carpropamid는 scytalone이 THN으로, vermelone이 DHN으로 탈수화 작용을 억제하는(Kurahashi *et al.* 1997) 반면에 tricyclazole은 회로상의 환원과정을 억제한다고 알려져 있다(Woloshuk *et al.*, 1980). 위와 같은 살균제들은 멜라닌 합성을 억제하여 세포독성을 가진 중간산물의 축적을 야기할 뿐만 아니라 식물병원성 진균의 여러 생리작용에 영향을 미치게 되고 부착기의 멜라닌화를 억제함으로써 infection peg의 형성을 감소시킨다(Hirooka *et al.*, 1982; Kubo *et al.*, 1982; Wolkow *et al.*, 1983). 그러나 많은 종류의 살

균제 및 이들의 유도체가 광범위하게 활용되고 있으나, 항진균 활성 스펙트럼과 잔류 및 독성 문제 등의 문제점을 내포하고 있다. 에탄올 추출물의 항진균 효과를 측정하기 위하여 일차적으로 군사의 방사상 성장(radial growth)을 접종 후 7일 후에 측정하였는데 (Table 8), 처리된 농도에서 정제된 플라보노이드 (Fig. 7)와 항진균 농약보다 삼백초에서 더 높은 억제율을 나타내었고, 상백피 또한 거의 대등한 억제율을 나타내었다. 항진균제를 처리한 배지에서 군사성장의 억제율은 12.3~20.6%로 플라보노이드 처리균이나 삼백초 및 상백피보다 낮았다.

포자형성에 있어서 삼백초, 등글레, 상백피 추출물을 처리한 배지에서 측정된 포자의 수는  $4\sim 8 \times 10^4$  이므로 항진균제인 fthalide ( $2 \times 10^4$ ) 보다 다소 많았지

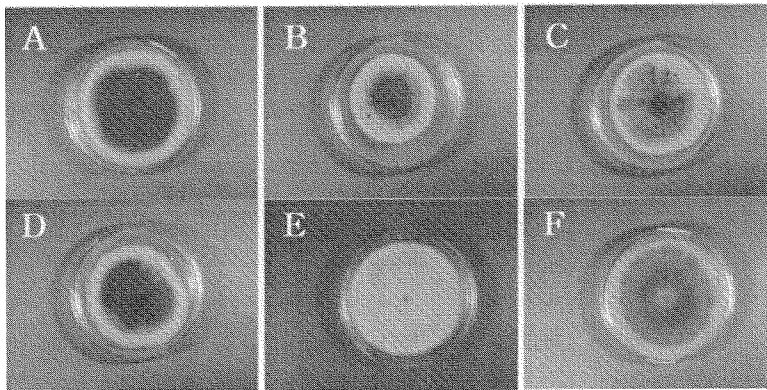


Fig. 4. Effects of lipolytic medium on mecelial pigmentation. control on PDA(A), tricyclazole on PDA (B), isoprothiolane on PDA(C), fthalide on PDA(D), lipolytic tryptone(E), lipolytic peptone(F)

Table 7. Size of anthracnose lesion on green pepper fruits caused by *Colletotrichum gloeosporioides* PC31.

Inoculation	Lesion size (mm) <sup>2</sup>		
	No treated media	Lipolytic media	Tricyclazole <sup>3</sup>
spore suspension <sup>1</sup>	13.8±1.89 <sup>4</sup>	11.9±2.50	15.8±1.68
agar plug	13.9±1.33	6.4±0.45	12.4±0.73

<sup>1</sup>Inoculum concentration =  $1 \times 10^6$

<sup>2</sup>Lesion was measured on wounded fruit by pin-pricking 7 days after inoculation and its size was calculated from the average of length and width.

<sup>3</sup>Treated concentration = 0.05 mM

<sup>4</sup>The value was the mean S.E of 10 replication.

만 tricyclazole이나 isoprothiolane을 처리한 배지에서 형성된 포자의 수( $1.8-2.8 \times 10^5$ ) 및 무처리한 배지에서 형성된 포자의 수보다 훨씬 적었다(Table 8). 삼백초 및 상백피의 추출물은 항산화 활성, 균사의 방사상 성장 억제, 멜라닌 합성 억제(Fig. 8) 및 포자형성 억제 활성이 다른 식물의 추출물 보다 우수한 것으로 평가된다. 따라서 이들 물질을 분리 정제하여 구조를 밝히고 항침투 살균제로 개발한다면 1차적으로 탄저 병원균의 침투를 억제하고 포자형성률이 감소되므로 발병부위로부터 식물의 다른 부위로 전파되는 2차 감염에 영향을 주기 때문에 결과적으로 병원성을 낮추는 역할도 할 것으로 사료된다. 포자의 형성, 방출,

분산은 병원성 진균의 생활사에 있어 결정적인 요인으로서 2차 감염을 방지하는 것도 절대적으로 필요하다.

다. Tyrosinase 활성 억제제 탐색 및 이를 이용한 멜라닌 합성억제

추출 시료 중 등글레, 황기, 상황버섯 등에서 추출한 물질을 mushroom tyrosinase와 혼합 처리하였을

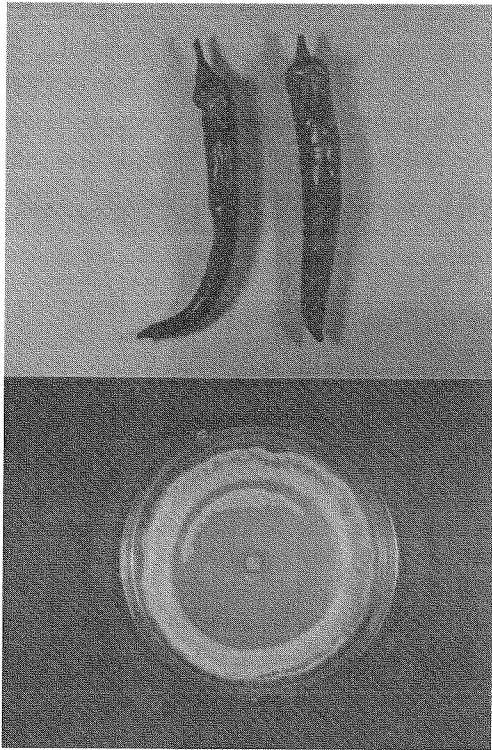


Fig. 5. Effects of lipolytic medium on pathogenesis.

Inoculation with inoculum (agar plug) punched from hyphae grown on lipolytic medium (left) and hyphae (control) grown on PDA (right) on wounded green pepper fruits. (A) Symptoms and (B) lipolytic inoculum source.

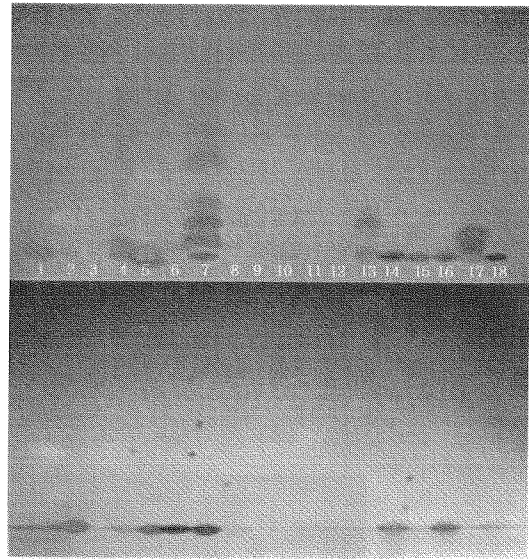


Fig. 6. TLC Chromatography.

(A) Various ethanol extracts from Korean ethnopharmaceutical plants. TLC was developed in toluene-ethyl acetate (93:7, v/v) and photographed under UV.

(B) Screening of free radical scavenging bands having antioxidant activity by DPPH staining, shown as yellow spot against purple background. From left to right lane 1 *Caururus chinensis*, 2 *Houttuynia cordata*, 3 red sweet pepper, 4 *Chrysanthemum coronarium*, 5 *Injinsuk*, 6 *Cichorium intybus*, 7 Chinese bellflower, 8 *Epimedium koreanum*, 9 *Carthamus tinctorius* (seeds), 10 *Discorea batatas*, 11 *Polygonatum odoratum*, 12 *Astragali membranaceus*, 13 *Morus alba* (stem bark), 14 quercetin, 15 catechin, 16 morin, 17 naringenin, 18 rutin

때 매우 긍정적인 결과를 얻었다. Metalloenzyme인 tyrosinase는 EDTA 혹은phenanthroline과 같은 metal chelator를 처리 시 활성이 강력히 억제된다. Fig. 9의 결과를 보면 40mM phenanthroline 및 40mM EDTA에서 효소활성이 완전히 사라짐을 관찰할 수 있고, 등글레 추출물 100 $\mu$ g 처리 시 완전 억제, 상항버섯의 추출물 50 $\mu$ g에서 부분적으로 억제되었으나 100 $\mu$ g 처리 시에는 거의 억제됨을 관찰할 수 있었다.

따라서 등글레 및 상항버섯에서 추출한 성분에 tyrosinase활성을 억제할 수 있는 억제제가 존재한다는 것이 판명되었다. 또한 26과 43종의 식물로부터 추출한 시료의 melanin 합성 저해 능력을 시험하기 위해 항 tyrosinase 활성을 spectrophotometer를 이용하여 측정된 결과 원추리, 등글레, 달래, 황기, 건가지 등에서 10% 이상의 저해능이 관찰되었다.

특히 등글레, 달래, 황기의 경우 처리한 결과 상업용으로 활용되고 있는 arbutin의 최대 저해능 보다 강력하게 측정되었다(Table 9). Tyrosinase 억제제 추출에 있어 가장 적절한 용매 시스템은 dichloromethane

이 물, ethanol 및 methanol 보다도 우수한 것으로 측정되었다. 따라서 향후 연구과제로 이들 물질의 구조를 규명하여 산업적으로 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

#### IV. 결론

##### 1. 살균제 내성 균주의 선발 및 유전적 다양성

대다수의 균주는 규칙적인 가장자리, 색소는 옐로우, 갈색, 흑회색 등 다양, 균사체의 높이가 높고 풍부하게 밀집, 방사상 콜로니, 전형적인 포자 및 크기는 다양하였다. 44균주의 병원성은 접종 후 고추표면에 약한 혹은 심한 대형 흑갈색 반점, 무병징 등 다양하였으며, 대다수가 G strain으로 동정되었고 청고추, 홍고추 모두 심하게 감염하였다. 고추 탄저병원균 36 균주의 각 살균제에 대한 저항성 분포는 약간 치우친 대칭형이었고 각 균주의 살균제에 대한 반응은 처리된 살균제 및 농도에 따라 감수성(sensitive), 중

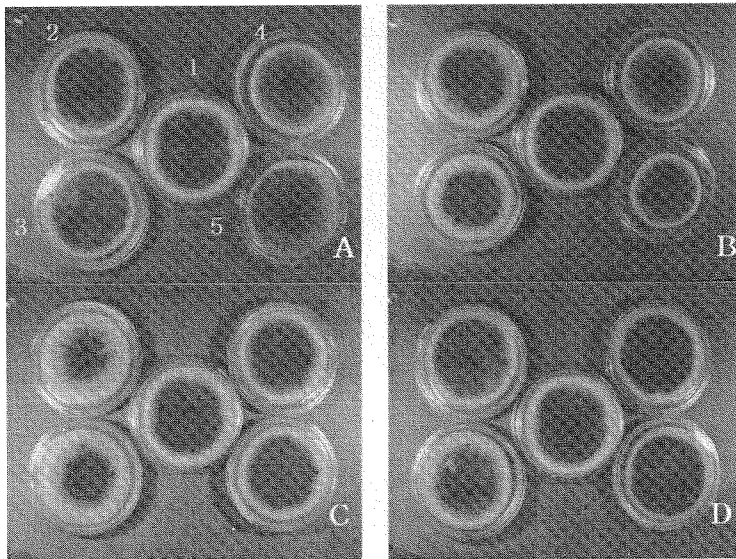


Fig. 7. Effects of flavonoids on mycelial pigmentation and growth.

(A) morin, (B) naringenin, (C) quercetin, and (D) rutin. Each has a set of 5 plates, showing pigmentation intensity. (1) control, (2) 20 $\mu$ g/ml, (3) 40 $\mu$ g/ml, (4) 80 $\mu$ g/ml, (5) 160 $\mu$ g/ml concentration of each flavonoid.

도저항성 (moderately resistant), 저항성 (highly resistant)의 3단계로 구별되었다. Mancozeb 감수성 균주는 시험된 균주 중 약 16%, 중도저항성 균주는 약 81.3%, 저항성 균주는 약 2.7%로 측정되었고, Chlorothalonil에 대한 반응은 감수성 균주는 약 8%, 중도저항성 균주는 약 62%, 저항성 균주는 약 30%로 측정되었다. Fenarimol에 대한 반응에서 감수성 균주는 약 5.4%, 중도저항성 균주는 약 86.6%, 저항성 균주는 약 8%로 측정되었다. 대다수의 균주들은 공통적으로 균사성장 및 포자발아율에 있어 mancozeb

에 감수성을 반면에 fenarimol에 대해서는 저항성을 보였다. Chlorothalonil은 균사성장을 효과적으로 억제하지 못하였으나 포자발아는 저농도에서조차 명백하게 억제하였다. Rep-PCR은 4개의 반복 primer를 이용하여 *Colletotrichum* spp. 44균주를 대상으로 실시하여 뚜렷한 band의 유무에 의해 공통군(common group; CG)과 변이군을 분리할 수 있었다. 공통군은 병원성 및 rep-PCR 분석 결과를 종합해 볼 때 전형적인 G strain으로 동정되었다. (CAG)<sub>5</sub>는 30개의 균주를 공통군(CG<sub>1</sub>)으로, (TGTC)<sub>4</sub>는 34개의 균주를

Table 8. Antioxidant, depigmentation, fungal growth inhibition activity of flavonoids, fungicides and ethanol extracts of various plants.

Samples (part)	Assays			
	lipid peroxidation inhibition	pigmentation	fungal growth inhibition <sup>4</sup>	number of spore <sup>5</sup>
catechin <sup>1</sup>	71	nd <sup>6</sup>	nd	nd
naringenin <sup>1</sup>	9	++++	27.8	nd
rutin <sup>1</sup>	47	+++++	17.0	nd
morin <sup>1</sup>	57	+++	21.6	nd
quercetin <sup>1</sup>	27	++++	15.9	nd
tricyclazole <sup>2</sup>	nd	++++	20.6	2.8x10 <sup>5</sup>
isoprothiolane <sup>2</sup>	nd	+++	12.3	1.8x10 <sup>5</sup>
fthalide <sup>2</sup>	nd	+++	27.8	2x10 <sup>4</sup>
<i>Sarururus chinensis</i> <sup>3</sup> (leaf)	31	+	32.9	8x10 <sup>4</sup>
<i>Houttuynia cordata</i> <sup>3</sup> (leaf)	17	+++	0	2.6x10 <sup>5</sup>
<i>Capsicum annum</i> <sup>3</sup> (fruit)	2	+++	0	nd
<i>Chrysanthemum coronarium</i> <sup>3</sup> (leaf)	0	+++	nd	nd
<i>Cichorium intybus</i> <sup>3</sup> (leaf)	0	+++	nd	nd
<i>Platycodon grandiflow</i> <sup>3</sup> (root)	0	+++	nd	nd
<i>Polygonatum odoratum</i> <sup>3</sup> (root)	nd	++	0.4	8x10 <sup>4</sup>
<i>Astragali membranaceus</i> <sup>3</sup> (root)	nd	nd	0	nd
<i>Morus alba</i> <sup>3</sup> (cortex)	nd	++	26.3	4x10 <sup>4</sup>
None-treated		+++++++	0	3.6x10 <sup>5</sup>

<sup>1</sup>Flavonoids are purchased from Sigma Co (USA) and treated at 160 µg/ml concentration into medium.

<sup>2</sup>Each fungicide was treated at 0.5 mM concentration into medium.

<sup>3</sup>Crude ethanol extract was treated at 1 mg/ml concentration into medium.

<sup>4</sup>Pigmentation was scored by the color intensity of reverse side of plate. Symbol - means no color (albino), + orange, ++ orange brown, +++ brown, ++++ dark brown, +++++ brown black, ++++++ dark gray black.

<sup>5</sup>Number of spores were counted from spore suspension scraping from hyphae.

<sup>6</sup>nd: no determination

Table 9. Antityrosinase activity of crude extracts of various plants by ethanol.

Family	Plant species	Dose( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	plant part	inhibition(%)
Araliaceae	<i>Aralia continentalis</i>	100	leaves, stem	0
	<i>Panax ginseng</i>	100	leaves	0
Aceraceae	<i>Acer palmatum</i>	100	leaves	0
Berberidaceae	<i>Epimedium koreanum</i>	100	leaves	0
Betulaceae	<i>Alnus japonica</i>	100	leaves	0
Compositae	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	100	leaves	2.7
	<i>Carthamus tinctorius</i>	100	seeds	0
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita pepo</i>	100	fruits	0
Cruciferae	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	100 l	eaves, roots	4.5
Cupressaceae	<i>Juniperus chinensis</i>	100 f	ruits	0
Dioscoreaceae	<i>Dioscorea batatas</i>	100	stem	0
Fogaceae	<i>Quercus acutissima</i>	100	leaves	0
	<i>Castanea crenata</i>	100	leaves	0
Ginkgoaceae	<i>Ginkgo biloba</i>	100	leaves	0
	<i>Glycine max</i>	100	leaves	0
Leguminosae	<i>Lespedeza bicolor</i>	100	leaves	0
	<i>Robinia pseudoacacia</i>	100	leaves	0
	<i>Hemerocallis fulva</i>	100	leaves, roots	15.8
	<i>Allium monanthum</i>	100	stem, roots	9.3
Liliaceae	"	250	stem, roots	47.9
	<i>Allium tuberosum</i>	100	leaves	0
	<i>Polygonatum odoratum</i>	100	roots	14.1
	"	500	roots	69.2
Magnoliaceae	<i>Magnolia kobus</i>	100	flower	0
	<i>Morus alba</i>	100	leaves	5.3
Oleaceae	<i>Forsythia koreana</i>	100	leaves	0
Opuntiaceae	<i>Opuntia ficus</i>	100	fruits	0
Pinaceae	<i>Pinus densiflora</i>	100	leaves	0
Rosaceae	<i>Prunus serrulata</i>	100	leaves	0
	<i>Rosa hybrida</i>	15000	leaves	9.1
	<i>Rubus crataegifolius</i>	100	leaves	0
Salicaceae	<i>Populus deltoides</i>	100	leaves	0
	<i>Populus euramericana</i>	15000	leaves	52
	<i>Salix babylonica</i>	100	leaves	0
Saururaceae	<i>Houttuynia cordata</i>	100	leaves	0
	<i>Caururus chinensis</i>	100	leaves	0
Solanaceae	<i>Solanum melongena</i>	100	fruits	10.5
Taxodiaceae	<i>Taxodium distichum</i>	15000	leaves	27.5
Umbelliferae	<i>Angelica keiskei</i>	100	leaves	0
	<i>Petroselinum sativum</i>	100	leaves	0
Vitaceae	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	100	leaves	0
Zingiberaceae	<i>Zingiber officinale</i>	100	tuber	7.9
Kojic acid	Commercial	10		32
"	"	50		43.2
"	"	100		76.5
"	"	200		80.4
Arbutin	"	10		2.0
"	"	200		5.5
"	"	500		11.7

Values are the mean of triplicate experiments.

Assay was repeated at least three times per samples.

Table 10. Antityrosinase activity of *Polygonatum odoratum* extracts by various organic solvents.

Concentration	water <sup>1</sup>	ethanol <sup>2</sup>	dichloromethane <sup>2</sup>	methanol <sup>2</sup>
10 $\mu\text{g/ml}$	15	5	17	-
50 $\mu\text{g/ml}$	11	25	23	-
100 $\mu\text{g/ml}$	11	29	25	21
200 $\mu\text{g/ml}$	11	38	40	32

<sup>1</sup>100°C for 1hr boiling

<sup>2</sup>60°C for 1hr boiling

공통군(CG<sub>2</sub>)으로, (GACAC)<sub>3</sub>는 29개의 균주를 공통군(CG<sub>3</sub>)으로, (GACA)<sub>4</sub>는 32개의 균주를 공통군(CG<sub>4</sub>)으로, 나머지는 각 변이군으로 분류하였다. 분석 결과 24개의 균주는 4개의 primer에 의해 항상 공통군으로 분류된 반면 8개 균주는 공통군에서 항상 제외되었다. 나머지 7개의 균주 4개의 primer 중 적어도 3개에 의해 공통군으로 분류되었고, 공통군과 84~96% 동질성을 보여 복제 변이로 고려된다. 3균주는 4개의 primer 중 적어도 2개에 의해서 공통군으로 분류되었고 동질성은 다양하였다. 2균주는 단지 (TGTC)<sub>4</sub>에 의해 공통군으로 분류되었으나 공통군과는 68~70% 범주에서 동질성을 보였고, 서로간에는 95% 동질성을 나타내었다. 균주 PC10은 공통군과 44%, reference isolates 40003(R strain)과는 75%, 40006(R strain)과는 38% 동질성을 나타냈고, 병원성 검정

결과 R strain으로 동정되었다. 균주 PC20는 공통군과 41%의 동질성을 보이는데, G와 R strain과는 유전적으로 판이한 변이주로 판단되었다. 또 다른 균주 PC28은 *C. gloeosporioides*의 모든 균주와의 동질성이 16~33%의 범주로, 보라색의 색소를 띠는 배양상의 특성과 홍고추에만 나타나는 약한 병원성 등을 종합하여 분석한 결과 유전적으로 상이한 다른 종으로 판단된다.

## 2. 멜라닌 합성억제제의 추출 및 활성분석

멜라닌 색소 결핍 돌연변이체를 유도하기 위해 tryptone 혹은 peptone이 첨가된 지방분해능 배지를 조제하여 PC31 균주를 접종하여 배양한 결과 tryptone 및 tween 20이나 -80을 첨가한 지방분해능 배지에서 효과적으로 균사체가 변형되고 멜라닌 색소가 결핍된 돌연변이체가 성장되었다. 멜라닌 결핍이 균주의 병원성과 어떤 관계가 있는가를 관찰하기 위해 지방분해능 배지에서 자란 균주의 포자 현탁액 및 agar plug를 푸른 고추에 접종한 결과 상처를 주지 않은 고추에서는 거의 감염이 일어나지 않았고 상처를 준 경우에도 wild type과 비교하여 탄저병 반점의 크기를 크게 감소하였다. 멜라닌 합성을 억제하는 물질을 탐색하기 위해 다양한 국내 자생식물로부터 물질을 유기용매에 의해 추출하고 항산화 및 항진균 활성을 결정하였다. 항산화 물질은 국내 자생식물의 추출물을 TLC chromatography를 한 후 DPPH 염색법과 지질과산화 억제활성을 측정한 결과 삼백초와 상백피에서 우수한 것으로 판명되었다. 기존의

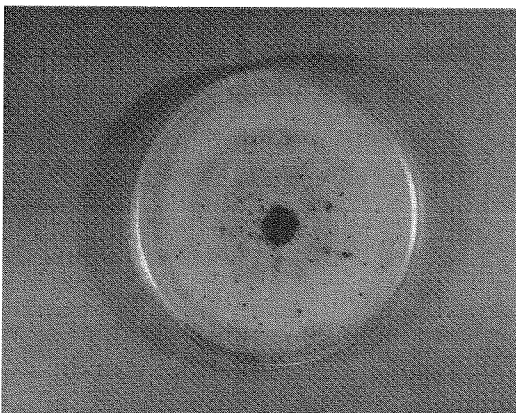


Fig. 8. Effects of ethanol extracts of *Caururus chinensis* on the mycelial pigmentation. Extracts were treated at 1mg/ml concentration into PDA.

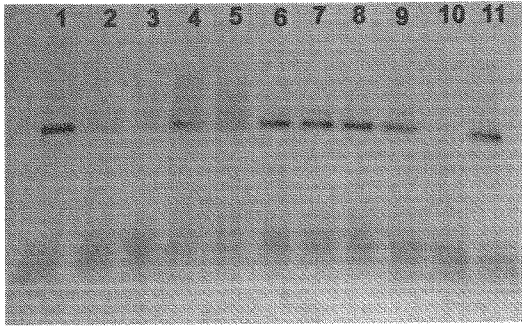


Fig. 9. 7.5% native gel, L-dopa staining, 37°C, 1hour incubation (sample : mushroom tyrosinase 20 $\mu$ g + 5x sample buffer 10 $\mu$ l + 1x upper tris 10 $\mu$ l). Lane 1; mushroom tyrosinase 5 $\mu$ g, 2; Added 40mM phenanthroline, 3; 등글레 100 $\mu$ g, 4; 상황버섯 50 $\mu$ g, 5; 상황버섯 100 $\mu$ g, 6; 홍화씨 50 $\mu$ g, 7; 홍화씨 100 $\mu$ g, 8; 마 50 $\mu$ g, 9; 마 100 $\mu$ g, 10; EDTA 40mM, 11; Hydroquinone 40mM.

멜라닌 합성을 억제하는 살균제로 널리 알려진 것은 tricyclazole, fthalide, isoprothiolane 등이 있는데, 활성작용부위에 다소 차이가 있고 항진균 활성 스펙트럼과 잔류 및 독성 문제 등의 문제점을 내포하고 있다. 따라서 국내자생 식물의 에탄올 추출물의 항진균 효과를 측정하였는데, 균사의 방사상 성장, 색소 및 포자 형성 억제 활성에 있어서, 삼백초 및 상백피의 추출물은 다른 추출물이나 기존 살균제 보다도 우수한 것으로 평가되었다. 또한 추출 시료 중 등글레 및 황기 등에서 추출한 물질을 mushroom tyrosinase와 혼합 처리하여 전기영동을 실시한 결과 tyrosinase 활성 밴드가 강력히 억제되었다. 따라서 등글레 및 상황버섯에서 추출한 성분에 tyrosinase 활성을 억제할 수 있는 억제제가 존재한다는 것이 판명되었다. 또한 26과 43종의 식물로부터 추출한 시료의 melanin 합성 저해 능력을 시험하기 위해 항 tyrosinase 활성을 spectrophotometer를 이용하여 측정한 결과 원추리, 등글레, 달래, 황기, 건가지 등에서 10% 이상의 저해능이 관찰되었다. 따라서 향후 연구과제로 이들 물질의 구조를 규명하여 산업적으로 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 인용 문헌

1. Bell AA, Wheeler MH. (1986), Biosynthesis and functions of fungal melanins, Annual Review of Phytopathology 24, 411~451.
2. Comm nil P, Brunet L, Audran JC. (1997), Antilipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*, Physiol. Mol. Plant Pathol. 52:1~14.
3. Comm nil P, Belingher L, Bauw G, Dehorter B. (1999), Molecular characterization of a lipase induced in *Botrytis cinerea* by components of a grape berry cuticle, Physiol. Mol. Plant Pathol. 55:37~43.
4. Freeman S, Pham M, Rodriguez RJ(1993), Molecular genotyping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primed PCR, A+T-rich DNA, and nuclear DNA analyses, Exp. Mycol. 17: 309~322.
5. Hirooka T, Miyagi Y, Araki F, Kunoh H, Ishizaki H. (1982), The effect of isoprothiolane on the emergence of infection pegs from appressoria of *Pyricularia oryzae*, Pestic. Sci. 13:379~386.
6. Howard R, Ferrari M. (1989), Role of melanin in appressorium function, Exp. Mycol. 13:403~418.
7. Lichter A, Mills D. (1998), Control of pigmentation of *Ustilago hordei*: The effect of pH, thiamine, and involvement of the cAMP cascade, Fungal Gen. Biol. 25:63~74.
8. Kawamura C, Tsujimoto T, Tsuge T. (1999), Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*, Mole. Plant-Microbe Interact. 12: 59~63.
9. Kimura N, Tsuge T. (1993), Gene cluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata*, J. Bacteriol. 175:4427



~4435.

10. Klattukudy PE. (1994), Cutinases from fungi and pollen. In: Borgstr m B, Brockman HL, eds. Lipases. Amsterdam, Elsevier, 471~504.
11. Kubo Y, Suzuki K, Furusawa I, Yamamoto M. (1982), Effect of tricyclazole on appressorial pigmentation and penetration from appressoria of *Colletotrichum lagenarium*, *Phytopathology* 72:1198~1200.
12. Kubo Y, Furusawa I. (1991), Melanin biosynthesis: Pre-requisite for successful invasion of the plant host by appressoria of *Colletotrichum* and *Pyricularia*. In *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals* (Cole GT, Hoch HC, eds), pp. 205~218. Plenum, New York.
13. Kubo Y, Takano N, Endo N, Yasuda N, Tajima S, Furusawa I. (1996), Cloning and structural analysis of the melanin biosynthesis gene encoding scytalone dehydratase in *Colletotrichum lagenarium*, *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4340~4344.
14. Kurahashi Y, Sakawa S, Kinbara T, Tanaka K, Kagabu S. (1997), Biological activity of carpropamid (KTU3616): A new fungicide for rice blast disease, *J. Pestic Sci.* 22:108.
15. Miranda M, Zarivi O, Bonfigli A, Porretta R, Aimola P, Pacioni G, Ragnelli AM. (1996), White truffles, like black ones, are tyrosinase positive, *Plant Sci.* 120:29~36.
16. Miranda M, Bonfigli A, Zarivi O, Ragnelli AM, Pacioni G. (1992), Truffle tyrosinase properties and activity, *Plant Sci.* 81:175~182.
17. Piattelli M, Fattorusso E, Nicolaus R, Magno S. (1965), The structure of melanin and melanogenesis, V, Ustilagomelanins, *Tetrahedron* 21:3229~3236.
18. Perpetua NS, Kubo Y, Yasuda N, Takano Y, Furusawa I. (1996), Cloning and characterization of a melanin biosynthetic THRI reductase gene essential for appressorial penetration of *Colletotrichum gloeosporioides*, *Plant Physiol.* 103:267~272.
19. Ragnelli AM, Pacioni G, Aimola P, Lanza B, Miranda M. (1992), Truffle melanogenesis correlation with reproductive differentiation and ascocarp ripening, *Pigment Cell Res.* 5: 205~212.
20. Rasmussen U, Svenning MM. (1998), Finger printing of cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences, *Appl. Environ. Microbiol.* 64:265~272.
21. Takano Y, Kubo Y, Shimizu K, Mise T, Okuno T, Furusawa I. (1995), Structural analysis of PKS1, a polyketide synthase gene involved in melanin biosynthesis of *Colletotrichum lagenarium*, *Mol. Gen. Genet.* 249:162~167.
22. Trail F, Kler W. (1990), Diversity of cutinase from plant pathogenic fungi: evidence for a relationship between enzyme properties and tissue specificity, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36:495~508.
23. Van Kan JAL, Van't Klooster JW, Wagemakers CAM, Dees DCT, Van der Vlugt-Bergmans CJB. 1007. Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:30~38.
24. Wolkow PM, Sisler HD, Vigil EL. (1983), Effect of inhibition of melanin biosynthesis on structure and function of appressoria *Colletotrichum lindemuthianum*, *Physiol. Plant Pathol.* 22:55~71.
25. Woloshuk CP, Sisler HD, Tokousbalides MC, Dutky SR. (1980), Melanin biosynthesis in *Pyricularia oryzae*: Site of tricyclazole inhibition and pathogenicity of melanin-deficient mutants, *Pestic. Biochem. Physiol.* 14:256.