

Prochloraz와 Triadimefon의 사과나무 腐爛病菌에 對한 作用機作

洪鍾旭 · 李東珍 · 金章億

慶北大學校 農科大學 農化學科

Mechanism of Action of Prochloraz and Triadimefon on *Valsa ceratosperma*

Jong-Uck Hong, Dong-Jin Lee and Jang-Eok Kim

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyungpook
National University, Taegu, 702-701, Korea

Abstract

In order to elucidate the action mechanism of prochloraz and triadimefon, the mycelia of the *Valsa ceratosperma* were treated with the compounds in vitro.

Analysis by GLC of the sterol extract from *Valsa ceratosperma* mycelia revealed one major peak and two minor peaks. Their relative retention time(RRT) relative to chloolesterol were 1.29, 1.48 and 1.82. The compounds with RRT 1.29 and RRT 1.82 were identified as ergosterol and 24-methylenedihydrolanosterol by GC/MS, respectively.

Five ppm of prochloraz and triadimefon applied to mycelia caused decrease in ergosterol content, whereas increase in 24-methylenedihydrolanoserol content in mycelia.

The longer treatment time and the higher concentrations of the chemicals resulted in the greater decrease in ergosterol and the greater increase in 24-methylenedihydrolanosterol.

Based on the analysis, it is considered that the two chemicals inhibit the ergosterol biosynthesis in *Valsa ceratosperma* by blocking C-14 demethylation as found previously in other fungi and yeasts.

緒 論

撒布된 農藥의 作用點을 糾明하는 일은 藥劑의 藥效, 새로운 藥劑의 開發 및 藥劑가 環境에 미치는 影響 등 여러 側面에서 커다란 意義를 갖는다.

現在 많이 使用되고 있는 殺菌劑의 作用機作을 크게 分類해 보면 polyoxins, kitazin-p 등과 같이 細胞壁의 合成을 阻害하는 것과 blasticidin S, kasugamycin 등과 같이 細胞의 構成成分인 단백질

질의 合成을 阻害하는 것, triarimol, cerulemin 및 DPA 등과 같이 細胞膜의 重要한 構成成分이면서 菌體內의 에너지 供給에 重要한 役割을 하는 脂質成分의 合成을 阻害하는 것 등이다¹⁻³⁾. 비록 細胞膜과 直接的으로 作用하는 殺菌劑들이 病菌의 防除에는 더욱 有用하다는 것이 證明되어 왔지만 最近의 관심은 膜을 構成하고 있는 成分의 合成을 阻害하는 物質에 對해 많은 研究가⁴⁾ 이루어져 있다.

1972年 Kodama 등⁵⁾은 *Cephalosporium caeruleum*의 培養物質에서 分離한 cerulenine을 *Saccharomyces cerevisiae*에 處理한 結果 acetyl-CoA

1989년 4월 15일 수리

Corresponding author: J.U. Hong

와 malonyl-CoA의 縮合反應을 阻害하여 acetoacetyl-CoA의 合成을 妨害함으로써 脂肪酸의 生合成과 lanosterol의 前段階인 squalene의 合成을 阻害한다고 하였다. 또 Kodama 等⁹⁾은 kitazin-P 및 edifenphos 등은 菌體內에서 燐脂質의 生合成을 阻害함으로써 菌의 膜透過性에 影響을 준다고 하였다.

또한 細胞膜의 構成成分으로서 重要한 役割을 하는 ergosterol은 大部分의 菌體細胞膜의 主 sterol로서 脂肪酸과 더불어 菌의 生長 및 增殖 등에 重要한 役割을 하는 것으로 알려져 있는데 1972年 Ragsdale 等에 의해 triarimol이 ergosterol의 生合成을 阻害한다는 것이 보고되었다⁷⁻⁹⁾. 그 후 다양한 化學構造를 가진 殺菌劑들이 菌의 生態에도 直接的인 影響을 주어 결국에는 菌을 死滅시키거나 成長을 停止시키키 報告되어 있다.

지금까지 ergosterol의 生合成을 阻害하는 많은 藥劑가 報告^{1-3, 10)}되었는데 이중 morpholine系의 藥劑를 除外한 대부분의 藥劑들은 生合成過程中 C-14의 demethylation을 阻害하는 것으로 밝혀졌다. 藥劑를 處理한 菌에서는 C-14 α methyl group을 가진 24-methylenedihydrolanosterol과 obtusifolii가 많이 축적되고 상대적으로 ergosterol은 줄어들는 것으로 알려져 있다^{11, 12)}.

Baldwin과 Wiggins¹³⁾은 triazole系인 dichlobutrazol을 *Ustilago maydis*에 處理했을 때 4-demethyl sterol인 ergosterol이 급격히 줄어든 反面에 4,4-dimethyl sterol인 24-methylenedihydrolanosterol과 4-methyl sterol인 obtusifolii가 상당히 增加하였다고 했다. 또한 Kato는 pyridine系의 殺菌劑인 buthiobate를 *Monilia fructigena*에 處理했을 때도 비슷한 樣相을 나타낸다고 報告한 바 있으며 Pappas와 Fischer⁹⁾는 dicarboximide系 殺菌劑인 vinclozoline, procymidone, iprodione과 이와 類似한 構造를 가진 prochloraz와 比較試驗한 結果 이들 藥劑 모두가 菌體의 呼吸作用이나 細胞膜 透過性 및 RNA 合成에는 影響을 주지 않았으나 iprodione의 경우에는 sterol 生合成과 DNA 合成을 阻害하는 反面 prochloraz는 sterol 生合成과 蛋白質合成을 阻害한다고 하였다.

따라서 本人 等은 triazole系인 triadimefon과 imidazole系인 prochloraz가 現在 우리나라에서 效果的인 防除에 問題가 되고 있는 사과나무 腐爛病菌에 抗菌性이 있다는 結果를 利用하여 이들 藥劑의 作用點이 細胞膜 構成成分인 ergosterol이 生

成되는 여러 過程들 중 어느 過程을 阻害시키는지를 밝히고자 in vitro에서 試驗하여 나온 結果를 報告하고자 한다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 供試農藥

Triadimefon은 Bayer社 製品의 原劑(90%)를, Prochloraz는 FBC社 製品의 原劑(96.2%)를 使用하였다.

2) 供試菌株

*Valsa ceratosperma*는 罹病樹皮에서 分離하여 培養하였으며 1個月마다 PDA斜面培地에 繼代培養하여 4°C에 保管하면서 使用하였다.

2. 實驗方法

1) Sterol의 分析

培養된 菌體中의 sterol 含量은 Baldwin과 Wiggins¹³⁾의 方法을 약간 變形하여 Fig. 1의 方法과 같이 分析하였다.

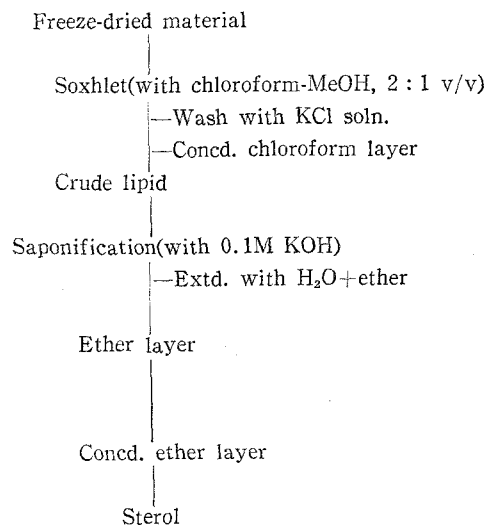


Fig. 1. Isolation of sterol from *Valsa ceratosperma*.

Sterol은 總脂質에 ethanol(80%)性 KOH 溶液 15ml를 加하고 0.1% pyrogallol溶液 1방울을 넣은 다음 85°C의 water bath에서 1時間 鹼化시킨 후 이를 ethyl ether로 2回 反復 抽出 後 減壓濃縮하여 ethyl ether 3ml에 再溶解하여 GLC分析用

試料로 使用하였다.

Sterol은 GLC(Hitachi 263-70) 및 mass spectrometer(Hewlett-Packard 598513 GC/MS system)를 使用하여 構造同定을 하였으며 이들의 分析條件은 Table 1,2와 같다.

Table 1. GLC parameters for sterol analysis with packed column

Item	Condition
Column	3% OV-17, glass 3mm ID X 2m L
Detector	F.I.D.
Carrier gas(N ₂)	45ml/min.
Chart speed	5mm/min.
Column temp.	270°C
Injector temp.	290°C
Detector temp.	290°C

Table 2. GLC-MS conditions for sterol analysis

Item	Condition
Column	OV-1, 0.25mm ID X 30m L, capillary
Column temp.	250°C
Carrier gas	30ml/min.
Ionizing voltage	70eV
Trap current	300μA

結果 및 考察

1. Sterol의 構造同定

腐爛病菌의 菌體로부터 抽出한 sterol의 GLC 分析結果 cholesterol의 retention time을 1로 基準했을 때 RRT(relative retention time)가 1.29인 peak의 GC/MS 分析結果 mass spectrum은 Fig. 2와 같이 M⁺이 m/z 396.3이고 주요 ion peak로서는 378.3, 363.2, 271.2 및 253.2 등을 隨伴하였으며 378.3(loss of H₂O), 363.2(loss of H₂O+CH₃), 337.2(produced by the splitting of ring A), 271.2(loss of side chain, C₈H₇) 및 253.2(loss

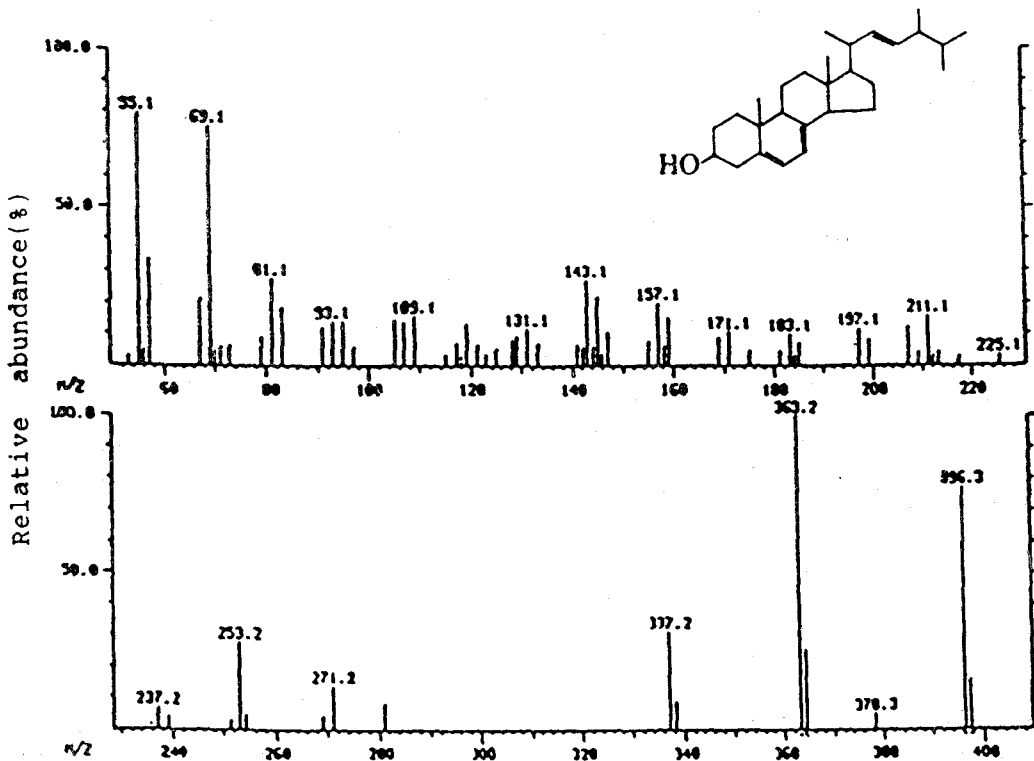


Fig. 2. Mass spectrum and structure of ergosterol isolated from *Valsa ceratosperma*.

of side chain and H₂O) 등의 特徴的인 peak^{15,16)}로서 RRT 1.29는 ergosterol로 判明되었으며, 이는 標準物質의 mass spectrum과 一致하였다.

RRT 1.82인 GLC peak는 GC/MS의 M⁺이 440.4로서 mass spectrum은 Fig. 3과 같다.

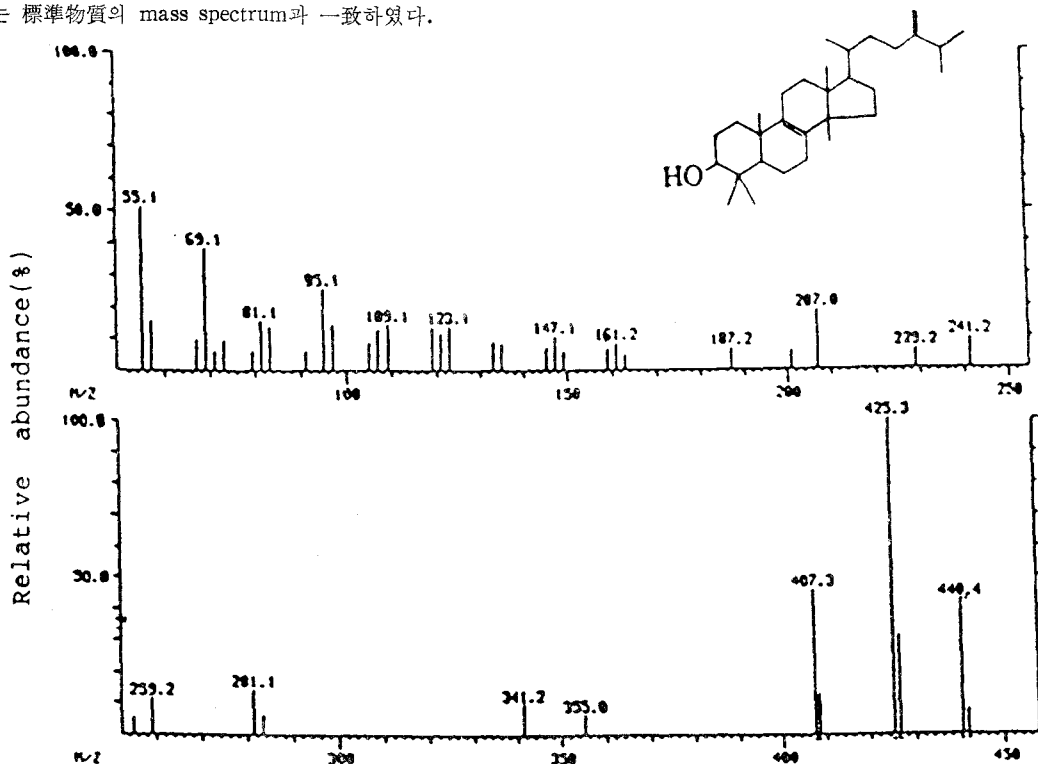


Fig. 3. Mass spectrum and structure of 24-methylenedihydrolanosterol isolated from *Valsa ceratosperma*.

M⁺이 440.4의 主要 ion peak는 m/z 425.3, 407.3, 341.2, 259.2, 241.2 등을 隨伴하였으며 m/z 425.3(loss of CH₃), 407.3(loss of CH₃+H₂O), 341.2(loss of CH₃+C₆H₁₂), 259.2(loss of CH₃+C₁₂H₂₂, produced by the splitting of ring D) 및 241.2(loss of CH₃+H₂O+C₁₂H₂₂) 등의 特徴的인 ion peak¹⁵⁾로서 RRT 1.82인 GLC peak는 24-methylenedihydrolanosterol로 同定되었으며 이는 標準物質의 mass spectrum과 一致하였다.

6日間 培養한 腐爛病菌에 prochloraz 및 triadimefon을 각각 5ppm 수준으로 處理한 것과 藥劑를 處理하지 않고 7日間 培養한 菌體에서 抽出한 sterol의 GLC chromatogram은 Fig. 4와 같다.

無處理(A)에서는 主 peak가 RRT 1.29인 ergosterol로서 이는 fung이에서 主 sterol이 ergosterol임을 報告한 Kato¹⁴⁾의 實驗結果와 同一하였으며 藥劑를 處理함에 따라 ergosterol의 peak는 줄어든 反面에 RRT가 1.82인 24-methylenedihydrol-

anosterol(24-methyllanosta-8, 24(28)-dien-3β-ol)은 相對적으로 增加하였고 prochloraz 處理時에는 오히려 ergosterol의 peak 보다 더 큰 main peak를 形成하였다.

2. Sterol의 組成變化

1) 濃도에 따른 組成變化

Prochloraz와 triadimefon의 處理濃도를 各各 달리하여 사과나무 腐爛病菌의 sterol合成의 變化를 보기 위해 PS液體培地上에서 6日間 定置 培養한 後 各各 0, 1, 5, 10ppm의 濃도가 되게 두 藥劑를 處理한 다음 7日째에 菌體를 收去하여 sterol을 抽出한 다음 GLC로 分析한 結果는 Table 3 및 4와 같다.

Table 3에서 보는 바와 같이 prochloraz를 處理했을 때 ergosterol의 含量은 無處理에서 보다 크게 줄어든 反面에 24-methylenedihydrolanosterol의 含量은 크게 增加하였다. 無處理에서는 ergo-

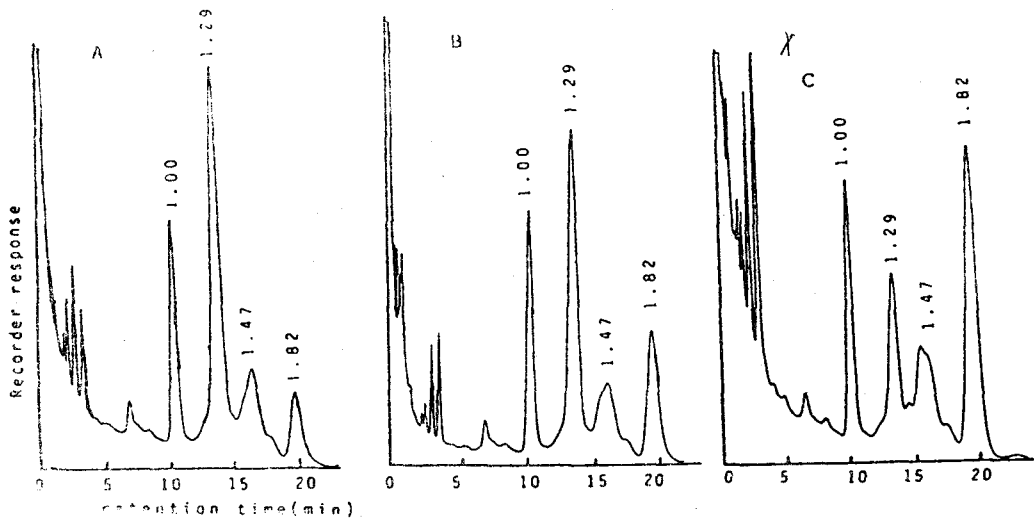


Fig. 4. Gas chromatographic analysis of sterols in mycelia of *Valsa ceratosperma* treated with triadimefon (5ppm) and prochloraz(5ppm) for 7 days.

(A) Sterols from untreated control mycelia, (B) Triadimefon-treated mycelia and (C) Prochloraz-treated mycelia. Relative retention times, 1.00, 1.29, 1.47 and 1.82 respectively indicate those of cholesterol(as an internal standard), ergosterol, unknown compounds and 24-methylenedihydrolanosterol.

sterol이 70.2%, eburicol(24-methylenedihydro-lanosterol)은 8.0%이었으나 1ppm 處理로 ergo-sterol의 量은 37.0%였고 eburicol은 41.0%로 增加되었다. 또한 5ppm, 10ppm으로 處理濃度가 높아질수록 ergosterol은 36.1% 및 35.0%로 그 含量이 줄었고 eburicol은 41.3% 및 43.0%로 增加하였다.

Triadimefon 處理 時에도 Table 4에서 보는 바와 같이 prochloraz處理 時와 마찬가지로 ergo-sterol의 含量은 處理濃度의 增加로 줄어든 反面 eburicol의 含量은 相對的으로 增加되었다. Triadimefon의 處理濃度가 0, 1, 5, 10ppm으로 增加함에 따라 ergosterol의 含量은 70.3, 50.1, 46.0 및 40.0%로 점점 減少되었고 eburicol의 含量은 相對的으로 6.4, 27.7, 30.9 및 37.6%로 增加되었다. 以上과 같은 結果는 Kato¹⁴⁾가 pyridine系인 buthiobate를 *Monilia fructigena*에 處理했을 때 ergosterol의 含量은 급격히 줄어든 反面에 24-methylenedihydrolanosterol의 含量이 크게 增加하였 으며, 아울러 obtusifolii의 含量도 相對的으로 增加하였다는 報告와 一致하는 傾向을 나타내었다.

Table 3. Effect of prochloraz(7 days after treatment) on the sterol composition of *Valsa ceratosperma*(6 days old) in fluid media

Conc. (ppm)	Sterol composition(%)		
	Ergosterol	Eburicol	Unknown
0	70.2	8.0	21.8
1	37.0	41.0	22.0
5	36.1	41.3	22.6
10	35.0	43.0	22.0

Table 4. Effect of triadimefon(7 days after treatment) on the sterol composition of *Valsa ceratosperma*(6 days old) in fluid media

Conc. (ppm)	Sterol composition(%)		
	Ergosterol	Eburicol	Unknown
0	70.3	6.4	23.4
1	50.1	27.7	22.2
5	46.0	30.9	23.1
10	40.0	37.6	22.4

2) 時間經過에 따른 sterol의 沮害

6日間 培養시킨 *Valsa ceratosperma*에 tri-

adimefon과 prochloraz를 各各 10ppm, 5ppm되게 處理하고 19, 24, 72, 120, 168時間 經過後 抽出하여 sterol을 GLC로 分析한 結果는 Table 5 및 6과 같다.

Table 5에서 보던 無處理에서는 時間이 經過됨에 따라 ergosterol의 含量은 65.0%, 68.5%, 70.1%, 70.3%로 계속 增加된 反面에 24-methylenedihydrolanosterol은 10.1%, 8.0%, 7.3%, 6.9% 및 6.4%로 減少되었다. 이는 ergosterol 生合成過程의 中間物質인 24-methylenedihydrolanosterol이 ergosterol의 合成이 進行됨에 따라 相對的으로 그 含量이 減少되어 나타난 結果로 생각된다.

Triadimefon 10ppm 處理時 ergosterol은 60.8, 59.1, 56.7, 48.7, 40.0%로 時間이 지난에 따라 減少되었고 反面에 24-methylenedihydrolanosterol의 含量은 17.5, 20.7, 21.7, 30.2, 37.6%로 增加하였다. 또한 prochloraz 5ppm을 處理했을 때 Table 6에서 보는 바와 같이 無處理時 ergosterol의 含量은 Table 5와 同一한 形態로 時間이 經過됨에 따라 66.0, 66.0, 68.2, 70.5, 70.2%로 계속해서 增加된 反面 24-methylenedihydrolanoste-

rol의 含量은 11.6, 11.8, 9.1, 9.0, 8.0%로 相對的으로 줄어들었다. 그러나 藥劑를 處理한 後의 ergosterol의 含量은 時間의 經過에 따라 줄어든 反面 ergosterol의 生合成中間物質인 24-methylenedihydrolanosterol의 含量은 相對的으로 19.6, 23.5, 26.5, 38.4 및 41.0%로 增加한 것으로 나타났다.

이러한 結果를 종합해 볼 때, triadimefon 및 prochloraz를 *Valsa ceratosperma*에 處理했을 때 ergosterol의 生合成 中間段階를 阻害시킴으로서 ergosterol의 量은 減少시킨 反面 中間物質인 24-methylenedihydrolanosterol의 量은 增加된 結果를 나타내었는데 이와 같은 結果는 Pappas와 Fischer⁹⁾가 imidazole系인 prochloraz와 triazole系인 triadimefon을 處理한 yeast와 fungi에서 ergosterol의 含量은 줄어든 反面에 24-methylenedihydrol 및 anosterol의 含量이 相對的으로 增加하였다는 報告와 一致하였다.

Ergosterol의 生合成은 lanosterol의 전구물질인 squalene이 生成된 後 lanosterol이 合成되어지고 C-24(25)의 이중결합이 이동되어 C-24(28)의

Table 5. Effect of triadimefon on the sterol composition of *Valsa ceratosperma*(6 days old) in fluid media

Time after treatment(hrs)	Sterol composition(%)		
	Ergosterol	Eburicol	Unknown
19	65.0° 60.8*	10.1° 17.5*	24.9° 21.7*
24	68.5 59.1	8.0 20.7	23.5 20.2
72	69.4 56.7	7.3 21.7	23.3 21.6
120	70.1 48.7	6.9 30.2	23.0 21.1
168	70.3 40.0	6.4 37.6	23.3 22.4

*Treated with triadimefon(10ppm). °Control.

Table 6. Effect of prochloraz on the sterol composition of *Valsa ceratosperma*(6 days old) in fluid media

Time after treatment(hrs)	Sterol composition(%)		
	Ergosterol	Eburicol	Unknown
19	66.0° 56.5*	11.6° 19.6*	22.8° 23.9*
24	66.0 52.2	11.8 23.5	22.2 24.3
72	68.2 53.8	9.1 26.5	22.7 19.7
120	70.5 39.8	9.0 38.4	20.5 21.8
168	70.2 37.0	8.0 41.0	21.8 22.0

*Treated with prochloraz(5ppm). °Control.

위치로 옮겨져 24-methylenedihydrolanosterol이 된 다음 C-14의 methyl group이 떨어져 4,4-dimethylergosta-8,14,24(28)-triene-3 β -ol이 생성되고 C-8(9)의 이중결합이 C-7(8)로 자리이동을 하고, 또 C-24(28)의 이중결합이 C-22(23)으로 자리이동하면서 ergosterol이 생합성되어 지는데 이 과정을 요약하면 Fig. 5와 같다.

이상의 결과 및 ergosterol의 생합성 과정을 종합해 볼 때 Kato¹⁴⁾가 *Monilia fructigena*에 pyridine계의 buthiobate를 처리했을 때 ergosterol의量は減少하고 24-methylenedihydrolanosterol의

量은 相對的으로 增加함으로써 ergosterol의 생합성 과정에서 C-14의 methyl group 이탈을 선택적으로 阻害하여 ergosterol의 생합성 中間物質인 4,4-dimethylergosta-8,14,24(28)-triene-3 β -ol의 생성을 阻害하여 結果的으로 ergosterol의 생합성 과정을 阻害한다는 報告와 같이 prochloraz와 triadimefon을 *Valsa ceratosperma*에 處理하였을 때 C-14에 있는 methyl group의 demethylation을 阻害하여 ergosterol의 含量을 감소시킨 反面에 24-methylenedihydrolanosterol의 含量을 增加시킨 것이 아닌가 推測된다.

초 록

사과나무 腐爛病菌(*Valsa ceratosperma*)에 對한 抗菌力이 인정된 prochloraz 및 triadimefon의 ergosterol 생합성 過程에 미치는 影響은 다음과 같다.

Triadimefon 및 prochloraz를 處理하지 않은 無 處理區에서는 時間이 경과함에 따라 ergosterol의 생합성이 계속되어 藥劑處理 後 19時間 後에 各各 65.0 및 66.0%이던 것이 168時間 後에는 各各 70.3, 70.2%로 增加되었고, 24-methylenedihydrolanosterol의 경우는 10.1 및 11.6%에서 6.4 및 8.0%로 時間이 經過함에 따라 減少하였다. 反面에 triadimefon 10ppm 處理時는 ergosterol의 含量은 60.8%에서 40.0%로 時間이 經過함에 따라 減少되었고 24-methylenedihydrolanosterol은 17.5%에서 37.6%로 增加하였다. 또한 prochloraz 5 ppm 處理時는 ergosterol은 56.5%에서 37%로 減少되었고 24-methylenedihydrolanosterol은 19.6%에서 41.0%로 增加되었다.

Ergosterol의 含量은 藥劑의 濃度가 높을수록, 그리고 處理 後 經過時間이 길수록 減少되었고 相對的으로 24-methylenedihydrolanosterol은 增加되었다.

따라서 *Valsa ceratosperma*에서 이들 두 藥劑는 C-14의 demethylation을 阻害하여 ergosterol의 생합성 過程을 阻害하는 것으로 推測된다.

謝 辭

本 研究는 1988年度 韓國學術振興財團의 研究費 支援으로 遂行된 研究의 一部이며 關係하신 여러 분께 깊은 感謝를 드립니다.

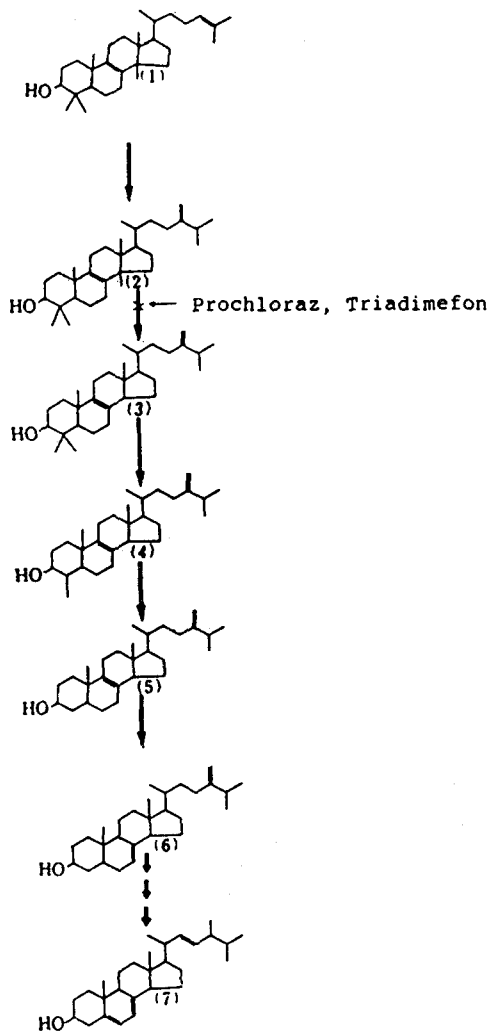


Fig. 5. Biosynthetic pathway of ergosterol in *Valsa ceratosperma* indicating the presumed site of inhibition by prochloraz and triadimefon. 1) Lanosterol, 2) 24-Methylenedihydrolanosterol, 3) 4,4-Dimethylfecosterol, 4) 4 α -Methylfecosterol, 5) Fecosterol, 6) Episterol and 7) Ergosterol.

참 고 문 헌

1. Yamamoto, I. and Fukami, J.: Pesticide Design-Strategy and Tactics-, p.169, Soft Science, INC. (1979)
2. Siegel, M.R. and Sisler, H.D.: Antifungal Compounds(Vol. 2), p.277, Marcel Dekker, INC., New York and Basel (1977)
3. 高橋信孝 : 農藥の科學, p.88, 文永堂(1979).
4. Miyamoto, J. and Kearney, P.C.: Pesticide Chemistry, p.129, Pergamon Press, International Union of Pure and Applied Chemistry(1983)
5. Kodama, O., Yamada, H., Hata, T. and Nomura, S.: J. Antibiot., 25 : 365(1975)
6. Kodama, O., Yamashita, K. and Akatsuka, T.: Agric. Biol. Chem., 44 : 1015(1980)
7. Ragsdale, N.N. and Sisler, H.D.: Bioche. Biophys. Res. Commun., 46 : 2048(1972)
8. Henry, M.J. and Sisler, H.D.: Pestic. Sci., 12 : 98(1981)
9. Pappas, A.C. and Fisher, D.J.: Pestic. Sci., 10 : 239(1979)
10. Miyamoto, J. and Kearney, P.C.: Pesticide Chemistry, p.33, Pergamon Press, International Union of Pure and Applied Chemistry (1983)
11. Yamamoto, S. and Bloch, K.: J. Biol. Chem., 245 : 1670(1970)
12. Barton, D.H., Gosden, A.F., Mellows, G.G. and Widdowson, D.A.: J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1067(1968)
13. Baldwin, B.C. and Wiggins, E.: Pestic. Sci., 15 : 156(1984)
14. Kato, T.: J. Pestic. Sci., 7 : 427(1982)
15. Toshior, K., Shizuya, T., Minoru, U. and Yasuo, K.: Agri. Biol. Chem., 39 : 169(1975)
16. Jauresuibery, G., Law, J.H., McCloskey, J. A. and Lederer, E.: Biochemistry, 4 : 347 (1965)